Aus der Abteilung für Medizinische Virologie
und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Leiter: Professor Dr. H. J. Gerth
am Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. Bader

Die Interferoninduktion durch Influenza Virus-Stämme mit Adaptation an verschiedene Wirte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ruland Hezel
aus Aalen

1974

75 19

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0070

Aus der Abteilung für Medizinische Virologie
und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Leiter: Professor Dr. H. J. Gerth
am Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. Bader

Die Interferoninduktion durch Influenza Virus-Stämme mit Adaptation an verschiedene Wirte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ruland Hezel
aus Aalen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Schlote

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Gerth

Korreferent: Professor Dr. W. Höfler

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Fragestellung der vorliegenden Arbeit 1

2. Literaturüberblick 2

3. Material

3.1 Viren 4
3.11 Influenza-Viren 4
3.12 Semliki-Forest-Virus 7
3.13 Sendai-Virus 7
3.2 Mäuse 7
3.3 Bruteier 8
3.4 Erythrocyten 8
3.5 Normalserum vom Pferd 8

4. Methodik

4.1 Bestimmung der Infektiosität 9
4.11 Hämagglutinationsmethode 9
4.12 Titration im Brutei 9
4.13 Virustitration in Zellkulturen 9
4.2 Untersuchung der Inhibitorenempfindlichkeit.. 10
4.3 Impftechnik 11
4.31 Brutei 11
4.32 Maus und Saugmaus 11
4.33 Zellkulturen 11
4.4 Herstellung und Züchtung der Zellkulturen ... 12
4.41 Hühnerembryofibroblasten (HEF) 12
4.42 Mäuseembryofibroblasten (MEF) 12
4.43 L-Zellen 12
4.44 Zellkulturmedien 13
4.441 Hanks' Salzlösung 13
4.442 Minimum Essential Medium 13
4.443 Hanks' Ly Medium 13
4.444 Agar-Overlay für HEF und L-Zellen 13
4.445 Antibiotikazusatz 14
4.446 Kälberserum 14
4.447 Trypsinlösung 14
4.45 Petrischalen 14
4.5 Interferonaufbereitung..... 15
4.51 Hühnerinterferon 15
4.52 Standardinterferon aus Mausserum 15
4.53 Mauslungeninterferon 16
4.54 Interferon aus Zellkulturen von HEF und MEF.. 16
4.6 Interferontitration durch Plaque-Reduktion... 17
4.7 Statistik 19
4.71 Bestimmung der Signifikanzschwellen für Virustitrationen 19
4.72 Bestimmung des Interferontiters 19

4.73 Bestimmung des Signifikanzbereiches des Interferontiters 20

5. Versuche und Ergebnisse

5.1 Vergleichende Untersuchung zu der Interferonproduktion im Hühnerei durch ei-, saugmaus- und erwachsenen-mausadaptierte "Plus-" und "Minus-"stämme 21
5.2 Interferonproduktion und Virusvermehrung bei den Influenza-Varianten $E^{(+)}$, $E^{(-)}$, $M^{(+)}$ $M^{(-)}$ und $BM^{(-)}$ in der Saugmauslunge 25
5.3 Vergleich der Virusvermehrung und Interferonproduktion der Influenzastämme in der Lunge der erwachsenen Maus mit den Ergebnissen in der Saugmauslunge 32
5.4 Vergleich der Interferonproduktion in Zellkulturen, Kreuzversuch mit Hühner- und Mäuseembryofibroblasten durch ei- und mausadaptierte Influenzastämme bei hohem Impftiter 39

6. Diskussion

6.1 Zusammenhänge zwischen Interferontitrations-zeitpunkt, Virusvermehrung und Antikörper-bildung in der Mauslunge 47
6.2 Vergleich der Interferonbildungsfähigkeit in der Lunge von Saugmaus, erwachsener Maus und in Zellkulturen 49
6.3 Zusammenhänge zwischen Virusvermehrung, Adaptation und Virulenz 51
6.4 Korrelation zwischen Virusvermehrung, Adaptation und Interferonproduktion im Gesamtorganismus und in Zellkulturen 52
6.5 Weitere Faktoren, die Adaptation und Interferon-wirkung beeinflussen 55
6.6 Korrelation zwischen Inhibitorempfindlichkeit und Interferonproduktion 56

7. Zusammenfassung 58

8. Literaturverzeichnis 59

Tabellen und Abbildungen

Tab.1: Influenzastämme (H2N2) der vorliegenden Untersuchungen 6

Tab.2: Vergleichende Darstellung von Virustiter, Interferontiter und Virusmenge je Interferoneinheit im Brutei, der Lunge von Saugmaus und erwachsener Maus 38

Tab.3: Vergleich der Virus- und Interferonproduktion bei der erwachsenen Maus und der Saugmaus aus Untersuchungen verschiedener Autoren 48

Abb.1: Plaquetest zur Darstellung der Plaque-Reduktion durch Interferonverdünnungen 18

Abb.2a-d: Vermehrung von Virus und Interferon im Brutei 24

Abb.3a:Vermehrungskurven von Tübingen/63 Varianten in der Saugmauslunge 26

Abb.3b:Vermehrungskurven von Tübingen/63 Varianten in der Lunge der erwachsenen Maus 26

Abb.4a-d: Vermehrung von Virus und Interferon in der Saugmauslunge am 2. Tag nach Infektion 30

Abb.4e-h: Vermehrung von Virus und Interferon in der Saugmauslunge am 4. Tag nach Infektion 31

Abb.5a-d: Vermehrung von Virus und Interferon in der Lunge der erwachsenen Maus am 2. Tag nach Infektion 34

Abb.5e-h: Vermehrung von Virus und Interferon in der Lunge der erwachsenen Maus am 4. Tag nach Infektion 35

Abb.6a-b: Interferonbildung in Zellkulturen von Hühnerembryofibroblasten bei gleichem Impftiter der verschiedenen Influenza-Varianten 43

Abb.7a-b: Interferonbildung in Zellkulturen von Mäuseembryofibroblasten bei gleichem Impftiter der verschiedenen Influenza-Varianten 46

1. Einführung in die Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Isaacs und Lindenmann (1957) entdeckten das Interferon als eine Ursache der Virusinterferenz. Ho stellte 1962 bei den beiden nahe verwandten Influenza-Stämmen A/PR8/34 und A/WS/34 eine unterschiedliche Fähigkeit zur Interferoninduktion fest. In den folgenden Jahren untersuchten mehrere Autoren (siehe Abschnitt 2) die Zusammenhänge zwischen Interferonproduktion, Virusvermehrung, -adaptation und -virulenz.

In vorliegender Arbeit wurde geprüft, ob eine Korrelation besteht zwischen Interferonproduktion und Virusadaptation einiger in unserem Labor vorliegender Influenza-Stämme-(H2N2).

Die in der Natur oder im Laboratorium vorliegenden Stämme bestehen aus einer Mischung von verschiedenen Typen genetisch stabiler Viruspartikel unterschiedlicher Mucoproteininhibitorempfindlichkeit. Diese korreliert bei eiadaptierten Stämmen mit gleichsinnigen Unterschieden in der Antikörperempfindlichkeit der Stämme (Choppin und Tamm 1960a, Gerth 1968). Es soll in vorliegender Arbeit zugleich untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Interferonbildungsfähigkeit und Seruminhibitorempfindlichkeit besteht.

Bei folgenden Untersuchungen werden zunächst die ei-, saugmaus- und erwachsenmaus-adaptierten Stämme im Brutei inkubiert und die erzeugten Interferontiter verglichen. Weiterhin wird die Interferonbildungsfähigkeit reifer und unreifer Organismen getestet. Zum Abschluß wird untersucht, ob die Ergebnisse im Gesamtorganismus mit den Ergebnissen in der Zellkultur übereinstimmen.

2. Literaturüberblick

Isaacs und Hitchcock berichteten 1960 in dem Artikel "Role of interferon in recovery from virus infections" über den Nachweis von Interferon in der Mauslunge ab dem 2. Tag nach Infektion mit Influenza-Virus.

Link und Raus wiesen 1961 den Abfall des Virusgehaltes in der Mauslunge ab dritten bis vierten Tag nach Influenzainfektion nach und brachten diesen Virustiterabfall in Zusammenhang mit der steigenden Interferonproduktion.

Über Unterschiede im Infektionsablauf bei der erwachsenen Maus und der Saugmaus berichtet 1961 Sawicki in der Arbeit: "Influence of age of mice on interferon from Sendai-virus infection". Er zeigt am Beispiel eines Paramyxovirus, daß in der Saugmauslunge hohe Virustiter und lange Viruspersistenz mit niedrigen Interferontitern korrelieren und niedrige Virustiter mit hoher Interferonkonzentration bei der erwachsenen Maus. Daraus ergibt sich eine größere Empfindlichkeit der Saugmaus gegen eine Virusinfektion als der erwachsenen Maus.

Link und Mitarbeiter zeigten 1964 in dem Artikel "Interferon formation during virus adaptation" die Interferonbildung im Verlauf der Virusadaptation auf. Sie stellten zwischen der dritten und vierten Passage einen Anstieg der Interferonproduktion fest und paralell dazu einen Anstieg der Virusproduktion bei Influenza-Viren. Diese Versuche erlaubten jedoch noch keine bestimmte Aussage darüber, ob die Interferonproduktion ein Charakteristikum für die Adaptation ist. 1965 stellten Link und Mitarbeiter in dem Bericht "Relationship between virus multiplication and interferon production in mouselungs after infection with adapted and unadapted influenza-viruses" fest, daß ein adaptierter Stamm mehr Interferon induziert als ein nicht adaptierter.

1970 stellten McLaren und Potter bei 10 z.T. verwandten Influenzastämmen in der Mauslunge fast durchgehend einen direkten Zusammenhang zwischen Virusvermehrung und Interferonproduktion fest, wobei in diesem System mit einigen Ausnahmen auch hohe Virulenz mit guter Interferonproduktion korreliert.

3. Material

3.1 Viren

3.11 Influenza-Viren

Die in vorliegenden Untersuchungen verwendeten Virusstämme Influenza-Tübingen/63/(H2N2) wurden von Gerth 1968 in Eipassagen durch mehrfache Endtitrationen mit bzw. ohne Pferdeserumzusatz in genetisch reine Pferdeserumempfindliche und -unempfindliche Stämme aufgetrennt. Beide Stämme wurden außerdem über vielfache Passagen (mindestens zwanzig) an die Saugmauslunge (Baur 1970) und an die erwachsene Maus (Gerth unveröffentlicht) adaptiert. Zur Erhaltung der genetischen Reinheit wurden einzelne Endtitration im Brutei mit und ohne Pferdeserum dazwischengeschaltet. Den Mauspassagen gingen je zehn Saugmauspassagen voraus, da die sofortige Adaptation vom Brutei an die erwachsene Maus nicht regelmäßig gelingt. Der Pferde- und Hühnerseruminhibitor-empfindliche Stamm ließ sich auch nicht an die Saugmauslunge adaptieren.

Die Antigenherstellung erfolgte durch Verimpfung geringer Virusmengen (100-1000 ID_{50}) in die Allantoishöhle von zehn Tage bebrüteten Hühnereiern. Die Ernte der Saatantigene erfolgte nach 36-stündiger Bebrütung bei 35°C. Die Ausgangstiter der Stämme wurden in HA- und EID_{50}-Einheiten festgelegt (vgl. Abschn. 411, 412) und die Pferde- und Hühnerseruminhibitor-Empfindlichkeit vor Versuchsbeginn überprüft. Die Hämagglutinationstiter der inhibitorempfindlichen Stämme ist dabei im Neutralisationstest durch Pferde- und Hühnerserum um mehr als drei Zehnerpotenzen reduziert gegenüber dem inhibitorempfindlichen Stamm. Das Antigen wurde in Ampullen von je 2 ml luftdicht eingeschmolzen und bei -80°C gelagert.

In Tabelle 1 sind die verwendeten Influenza-Stämme mit ihrer Pferde- und Hühnerseruminhibitorempfindlichkeit, der genauen Stammbezeichnung mit Passagenzahl und dem Infektiositätstiter des Ausgangsmaterials in HA- und EID_{50}-Einheiten aufgeführt. In Spalte 4 sind die Abkürzungen für die Varianten angegeben: "E" bedeutet eiadaptiert, "M" an die erwachsene Maus adaptiert, "BM" an die Saugmaus adaptiert. Das angehängte $^{(+)}$- oder $^{(-)}$-Zeichen bedeutet Pferde- und Hühnerserum-inhibitorempfindlichkeit $^{(+)}$ oder -unempfindlichkeit $^{(-)}$.

Tabelle 1

Influenzastämme (H2N2) der vorliegenden Untersuchungen

Adaptation	Inhibitor-empfindlichkeit	Stammbezeichnung und Passagenzahl	Abk.	Titer des Ausgangsmaterials in HA	Titer des Ausgangsmaterials in EID_{50}
Brutei	P-empfindlich H-empfindlich	Influenza Tübingen/63^{P+H+} E_{20}	E+	320	10^{9}
Brutei	P-unempfindlich H-unempfindlich	Influenza Tübingen/63^{P+H+} E_{22}	E-	1280	$10^{8,75}$
Erw.Maus-lunge	P-empfindlich H-empfindlich	Influenza Tübingen/63^{P+H+} $E_{16}BM_{10}E_{1}ET_{1}M_{15}ET_{1}M_{9}ET_{2}$	M+	320	$10^{7,8}$
Erw.Maus-lunge	P-unempfindlich H-empfindlich	Influenza Tübingen/63^{P-H+} $E_{10}BM_{10}E_{1}M_{24}MP_{2}ET\ P_{4}$	M-	320	10^{8}
Saugmaus-lunge	P-unempfindlich H-unempfindlich	Influenza Tübingen/63^{P-H-} $E_{10}BM_{35}E_{1}$	BM-	1280	10^{9}

Abkürzungen für Spalte 2 und 3:

P = Pferdeserum
H = Hühnerserum
E = Bruteipassage
M = Passage über erwachsene Maus
BM = Saugmauspassage
ET = Passage über Endverdünnung

3.12 Semliki-Forest-Virus (SFV)

Das SFV wurde zur Plaquebildung in Hühnerembryofibroblasten und L-Zellen verwendet (siehe Methodik 433, 443). Das Ausgangsmaterial wurde dem Institut von Prof. Dr. Eh. Kunz (Hygiene-Institut der Universität Wien) überlassen und als Lyophilisat bei $4^{o}C$ gelagert. Das Saatantigen wurde durch Vermehrung in Gehirnen von Saugmäusen gewonnen. Dabei wurde fünf Tage alten Säuglingen je 0,01 ml Virussuspension intracraniell injiziert und das Gehirn nach zwei Tagen mit dem Auftreten von Enzephalititssymptomen geerntet, homogenisiert, suspendiert und der Überstand nach Filtration auf ca. 80 plaque-forming-units je 0,2 ml (vgl. Abschn. 4.13) eingestellt und in kleinen Mengen verpackt bei $-70^{o}C$ gelagert.

3.13 Sendai-Virus

Das Sendai-Virus diente zur Herstellung von Standardinterferon aus Mäuseserum. Das Virus stammt von Dr. H. G. Pereira, National Institute for Medical Research, London, und wurde unserem Institut von Prof. Dr. Rott (Institut für Virologie, Fachbereich der Veterinärmedizin der Universität Gießen) überlassen.

Die Höhe des Infektiositätstiters von $10^{8}EID_{50}/0,2$ ml (vgl. Methodik Abschn. 4.421) wurde in Bruteipassagen erreicht.

3.2 Mäuse

Als Zuchttiere wurden Mäuse des NMRI-Stammes aus der Zucht des Hygiene-Instituts der Universität Tübingen verwendet. Die Saugmäuse (Abkürzung BM) waren 1 bis 2 Tage alt, die erwachsenen Tiere (Abkürzung M) 4 bis 6 Wochen. Zur Herstellung der Mausembryofibroblasten-

kulturen dienten 16 - 18-tägige Embryonen.

3.3 Bruteier

Die Bruteier stammten vom Ammerhof Tübingen. Die Inkubation betrug 10 Tage bei 37°C.

3.4 Erythrocyten

Die Erythrocyten für die Hämagglutinationsmethode wurden unter Zusatz von 15% Citrat-Dextrose-Lösung durch Punktion der Flügelvene von weißen Leghorn-Hybrid-Hühnern gewonnen. Die Weiterverarbeitung erfolgte im Zeitraum von 24 - 96 Stunden nach Entnahme n.d.von Clarke und Casals (1958) angegebenen Methode.

3.5 Normalserum vom Pferd

Das Pferdeblut wurde unserem Institut von Herrn Dr. Timm von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen (Direktor Prof. Dr. Mussgay), zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum in Portionen von 50 ml eingefroren.

4. Methodik

4.1 Bestimmung der Infektiosität

4.11 Hämagglutinationsmethode

Es wurde die vom "Expert Committee on Respiratory Virus Diseases" (1959) empfohlene Methode verwendet. Sie beruht auf der Tatsache, daß Influenza-Viren Erythrocyten zu agglutinieren vermögen. Die Reaktion wurde in Plexiglasplatten durchgeführt. Nach einer Sedimentationszeit von 45 Minuten wurde der Grad der Agglutination nach dem Sedimentationsmuster geschätzt. Als hämagglutinierende Einheit (HA) wurde die Virusmenge definiert, die unter den oben genannten Bedingungen in der Lage war, noch eine vollständige Hämagglutination zu bewirken.

4.12 Titration im Brutei

Von einer Virussuspension wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (Faktor 10) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 4 Bruteier mit je 0,2 ml Antigenverdünnung in die Allantoishöhle geimpft. Als Maß für die Infektiosität wurde die $ID_{50/0,2\ ml}$ verwendet, die nach der 1931 von Kärber angegebenen Formel berechnet wurde.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die EID_{50} als Maß für den Virustiter des Mauslungengewebes verwendet.

4.13 Virustitration in Zellkulturen

Die Einstellung einer Virussuspension auf 20 - 80 plaque-forming-units (PFU) je 0,2 ml erfolgte nach der 1952 von Dulbecco entwickelten und 1964 von Finter

modifizierten Plaque-Agar-Overlay Methode.

4.2 Untersuchung der Inhibitorenempfindlichkeit

Die Empfindlichkeit der Influenza-Stämme gegenüber Serummucoproteininhibitoren wurde in der Hämagglutinationshemmungsreaktion gegenüber Pferde- und Hühnerseren getestet. (Methode nach Empfehlungen des "Expert Committee on Respiratory Virus Diseases"(1959); Untersuchungen von Gerth, 1968).

Als Hämagglutinationshemmungstiter wird der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung angegeben, die die Hämagglutination durch vier Einheiten Antigen noch zu mindestens 75% hemmt. Statt Antiseren wurden Normalseren von Pferd und Huhn verwendet.

Vor der Anwendung wurden die Seren zur Steigerung der Aktivität der Inhibitoren 30 Minuten bei 56°C erwärmt (Tamm und Choppin 1960b).

Die Aufteilung in $^{(+)}$- und $^{(-)}$- Stämme (Tamm und Choppin 1960b) wurde von Gerth (1968) differenziert in Pferde- und Hühnerseruminhibitor-empfindliche bzw. -unempfindliche Stämme, da nach letzteren Untersuchungen keine Paralellität in dem Verhalten eines Influenza-Stammes-(H2N2) gegenüber Pferde- und Hühnerseruminhibitoren besteht.

Diese Unterschiede wurden in Tab. 1 in die Stammbezeichnung der Influenza-Stämme aufgenommen. Die quantitative Analyse von $P^{(+)}$- und $P^{(-)}$- bzw. $H^{(+)}$- und $H^{(-)}$-Partikeln erfolgte durch Vergleich der Hämagglutinationshemmtiter (HAD) gegen Pferde- und Hühnerseren.

$P^{(-)}$-Stamm: Titerdifferenz von HA und HAD mit Pferdeserum maximal eine Titerstufe.

$P^{(+)}$-Stamm: Vollständige Hemmung durch Pferdeserum. Titer < 3 in der HAD.

$H^{(-)}$-Stamm: Titerdifferenz von HA und HAD mit Hühnerserum maximal eine Titerstufe.

$H^{(+)}$-Stamm: Vollständige Hemmung durch Hühnerserum. Titer < 3 in der HAD.

4.3 Impftechnik

4.31 Brutei

10 Tage alte Bruteier wurden mit einem Impftiter von ca. $10^3 EID_{50/ml}$ in die Allantoishöhle geimpft und weitere 48 Stunden für die Virusgewinnung und 72 Stunden für die Interferongewinnung bebrütet. Danach wurde die Allantoisflüssigkeit unter sterilen Kautelen geerntet und als Antigen bei -70°C in Ampullen gelagert bzw. als Interferon aufbereitet.

4.32 Maus und Saugmaus

Die erwachsenen Mäuse wurden in leichter Äthernarkose mit je 3 Tropfen Allantoisflüssigkeit (Infektiositätstiter $10^6 EID_{50/ml}$) intranasal beimpft. Den Saugmäusen wurde ohne Narkose je 1 Tropfen Allantoisflüssigkeit (Infektiositätstiter $10^4 EID_{50/ml}$) auf die Schnauze gegeben.

4.33 Zellkulturen

Die Petrischalen mit dichtem Zellrasen wurden nach dem Verwerfen des Anwachsmediums mit je 5 ml warmer phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2) gespült. Danach wurde mit einer Kapillarpipette 0,2 ml Virussuspension mit ca. 80 PfU ausgesät. Nach einstündiger Absorptionszeit bei 37°C und zweimaligem Spülen wurde mit Agar überschichtet (wie unter 4.444 beschrieben).

4.4 Zellkulturen

4.41 Hühnerembryofibroblasten (HEF)

Sie dienten zur Produktion und Austitrierung von Hühnerinterferon. Die Herstellung erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Dulbecco (1952). Die Hühnerembryonen wurden dem 10 Tage bebrüteten Ei entnommen. Der Kopf, die Extremitäten und Eingeweide wurden verworfen, der Rest in kleine Stücke geschnitten und 3x mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2) gewaschen. Die Gewebsstücke wurden bei 37°C mit einem Magnetrührer in 0,25% Trypsin in Kochsalzphosphatpuffer eine Stunde gerührt. Die Zellsuspension wurde durch eine dreischichtige Lage Verbandmull filtriert und bei etwa 2 g 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde 0,5 volumprozentig mit Anwachsmedium (Hanks' Ly mit Antibiotika und 15% Kälberserum) in Petrischalen ausgesät und in PVC-Kästen in 5% CO_2-Athmosphäre bei 37°C inkubiert. Nach ein bis zwei Tagen war der Zellrasen dicht.

4.42 Mäuseembryofibroblasten (MEF)

Sie dienten zur Produktion von Mausinterferon . Die Herstellung erfolgte analog der unter 4.41 beschriebenen Methode nach Baron und Buckler (1963). Als Ausgangsmaterial dienten 16 - 19tägige Mausembryonen. Die Zellen wurden ausgesät in einem MEM-Wachstumsmedium unter Zusatz von 10% Kälberserum. Die Zellrasen waren nach zwei bis drei Tagen dicht.

4.43 L-Zellen

Diese Dauerlinien entstammen einem Subcutansarkom der Maus. Der Stamm wurde mir freundlicherweise überlassen

von Prof. Dr. Jungwirt, Würzburg (Institut für Virologie und Immunologie, Direktor Prof. Dr. Wecker). Als Anwachsmedium diente MEM-Medium mit 10% Kälberserumzusatz. Die Zellkulturen wurden alle drei Tage gedrittelt und in Kulturflaschen bei 37°C inkubiert. Als Depot wurde ein Sediment aus L-Zellen der Wachstumsphase mit MEM-Medium unter Zusatz von 10% Glycerin (Merck) nach Einfrieren im Aceton-CO_2Schnee-Bad bei -80°C gelagert. Die Wiederverwendung war 6 Monate lang nach raschem Auftauen im Wasserbad von 37°C möglich. Die L-Zellkulturen dienten zum Austitrieren von Mausinterferon.

4.44 Zellkulturmedien

4.441 Hanks' Salzlösung

Herstellung nach dem Rezept aus "Diagnostic Procedures in Viral and Rickettsial Diseases"(1964)

4.442 Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

Mit Hanks' BSS mit Glutamin (bezogen als Trockenpulver der Firma Serva).

4.443 Hanks' Ly Medium

Das Medium hat nach Angaben von Fogh und Lund (1957) folgende Bestandteile: Hanks' Salzlösung, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Lactalbuminhydrolysat, 0,7% Bikarbonat.

4.444 Agar-Overlay für HEF und L-Zellen

TC 199 (Morgan, Morton und Parker 1950) Hanks' based

(Difco, BBL, Serva), mit Antibiotikazusatz (s.u.) in zweifacher Konzentration unter Zusatz von 15% Kälberserum wurde gemischt mit zweiprozentigem Noble Agar (Difco) im Verhältnis 1:1. Das Ausgießen auf die Zellrasen erfolgte nach Abkühlung des im Wasserbad erhitzten Mediums auf 38 - 42°C.

4.445 Antibiotikazusatz

Allen Kulturmedien wurden zugegeben:
100 IE Penicillin/ml Medium; 100 γ Streptomycin/ml Medium

4.446 Kälberseren

Die Seren stammten vom Schlachthof Tübingen von jungen Kälbern. Nach der Hitzeinaktivierung von 30 Minuten bei 56°C wurden sie 10% - 15%ig den Nährmedien beigesetzt und auf BHK-Zellkulturen auf Toxizität geprüft.

4.447 Trypsinlösung

Die Lösung wurde nach einem Rezept aus "Diagnostic Procedures in Viral and Rickettsial Diseases" (1964) 0,25% in Phosphatpuffer ohne Calcium- und Magnesiumionen hergestellt.

4.45 Petrischalen

Die Zellkulturen wurden in Petrischalen von 5 cm Durchmesser aus "oberflächenbehandeltem" Plastik der Fa.Greiner & Söhne, Nürtingen, hergestellt.

4.5 Interferonaufbereitung

4.51 Hühnerinterferon

Mit jedem Stamm wurden zehn Bruteier beimpft und weitere 72 Stunden inkubiert. Von jedem Brutei derselben Impfserie wurden 5 ml Allantoisflüssigkeit gepoolt und gleiche Ausgangsmengen der verschiedenen Pools weiterverarbeitet.

Die Reinigung des Hühnerinterferons erfolgte nach der Methode von Fantes (1967) durch Präzipitation mit Methanol. Die Allantoisflüssigkeit wurde mit 1 n und 1/10 n HCL auf pH 2 eingestellt, danach Methanol im Volumen-Verhältnis 5:1 zugesetzt. Nach 16stündiger Lagerung bei 4°C erfolgte Zentrifugation von einer Stunde bei 2200 g. Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand wurde gegen Hanks' Salzlösung mit 5 Teilen Methanol bei einem pH von 7,5 (eingestellt mit 1 n NaOH) 16 Stunden dialysiert. Das präzipitierte Interferon wurde durch einstündige Zentrifugation bei ca. 2200 g sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes in den den Ausgangsvolumina entsprechenden Mengen Hanks' Salzlösung gelöst und zur Entfernung der toxischen Methanolreste gegen große Mengen PBS (pH 7,2) dialysiert. Nach Angaben von Fantes (1967) wird durch diese Methode eine Reinigung, bezogen auf Protein, um das zwei- bis dreifache erreicht und eine Konzentration des Interferons um das vierfache gegenüber der Ausgangslösung.

4.52 Standardinterferon aus Mausserum

Nach den Beobachtungen von Baron und Buckler (1963) werden hohe Seruminterferontiter bei Mäusen bereits vier Stunden nach intravenöser Injektion von großen Mengen Sendai-Virus erreicht. Im vorliegenden Versuch wurde

10 Mäusen je 0,2 ml Allantoisflüssigkeit mit einem Sendai-Virusgehalt von $10^{8,5}EID_{50/ml}$ in die Schwanzvenen injiziert. Nach vier Stunden wurde je Maus 1,5 - 2 ml Blut durch Herzpunktion abgenommen und mit 1 n HCL auf pH 2 eingestellt. Das Serum wurde zur Inaktivierung der Viruspartikel 48 Stunden bei pH 2 und 4°C gelagert. Nach Neutralisierung mit 1 n NaOH erfolgte die Austitrierung. Das Standardinterferon lief als Kontrolle bei allen Mausinterferontitrationen mit.

4.53 Mauslungeninterferon

Die Interferonaufbereitung erfolgte im wesentlichen nach der von Isaacs und Hitchcock (1960) beschriebenen Methode. Am 2. und 4. Tag nach Infektion wurden die Lungen von je 10 erwachsenen Mäusen und je 30 Saugmäusen in Chloroformnarkose entnommen, mit 80 Gewichtsteilen PBS-Salzlösung versetzt, in sterilen Glasmörsern homogenisiert und eine Stunde bei ca. 2200 g zur Entfernung der Gewebsteile zentrifugiert. Die Lungenextrakte wurden zuerst zur Zerstörung der Viruspartikel 48 Stunden bei 4°C gegen pH 2 dialysiert (Einstellung auf pH 2 mit 1 n HCL-Lösung). Dann wurden die Lungenextrakte gegen PBS (p H 7,2) rückdialysiert und mit PBS-Lösung auf die Ausgangsvolumina eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

4.54 Interferon aus Zellkulturen von HEF und MEF

Fibroblastenkulturen von 15 -17tägigen Mausembryonen wurden mit je $10^{7}EID_{50/0,2\ ml}$ Virussuspension infiziert. Nach einer Stunde Absorptionszeit und 5 Tagen Inkubationszeit wurde das interferonhaltige Medium gewonnen und nach Ruiz-Gomez und Isaacs (1963) zur Zerstörung der Viruspartikel 30 Minuten bei 65°C erhitzt. Außerdem wurde das Medium 48 Stunden (wie unter 4.53 beschrieben) gegen pH 2

dialysiert. Die Aufbereitung des Hühnerembryofibroblasten-interferons erfolgte in analoger Weise.

Der Gehalt der Median an hämagglutinierenden Viruspartikeln vor der Hitzeinaktivierung war so gering, daß die Hämagglutinationsreaktion negativ war.

4.6 Interferontitration durch Plaque-Reduktion

Die Technik der Interferontitration basiert auf der Plaque-Agar-Overlay Methode von Dulbecco (1952). Finter entwickelte 1964 eine Methode zur Titerbestimmung von Mausinterferon in L-Zellkulturen mit Semliki-Forest-Virus. Diese Methode liegt in modifizierter Form diesen Untersuchungen zugrunde. In analoger Weise wurde Hühnerinterferon in Hühnerembryofibroblastenkulturen mit Semliki-Forest-Virus austitriert. Die Interferonverdünnungen (Quotient der Verdünnungsreihe 1:2) wurden in Portionen zu je 4 ml den Zellkulturplatten beigegeben und 12 Stunden bei 37°C in einer 5% CO_2-Atmosphäre inkubiert. Zum Entfernen der Interferonreste wurde zweimal mit Hanks' Salzlösung gespült. Auf jede Zellkulturplatte wurden 0,2 ml einer Virussuspension gegeben, die 20 - 80 plaquebildende Einheiten Semliki-Forest-Virus enthielt. Die Adsorptionszeit betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur. Der nicht absorbierte Anteil wurde durch zweimaliges Waschen mit Hanks' Salzlösung entfernt. Anschließend erfolgte Agarüberschichtung nach der unter 4.444 angegebenen Methode. Nach 2 - 3 Tagen waren die cytopathischen Effekte so groß, daß sie nach Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot makroskopisch als ungefärbte Plaques sichtbar wurden. Der Neutralrotfarbstoff diffundierte aus einer zweiten Agarschicht (mit 0,1% Neutralrot) innerhalb 6 - 12 Stunden im Dunkeln in den Zellrasen. Der reziproke Wert der Interferonverdünnung, bei der die Plaquezahl um 50% gegenüber den Kontrollplatten reduziert wird, ist definiert als der Interferontiter

Abb.1: Plaquetest zur Darstellung der Plaque-Reduktion durch Interferonverdünnungen

(in 50% Plaque-reduzierenden Einheiten je 4 ml).

Abb. 1 zeigt die Plaque-Reduktion in Abhängigkeit von der Interferonverdünnung. Eine Verschiebung der Empfindlichkeit der Zellkulturen wird durch die Kontrollplatten mit Standardinterferon und ohne Interferon erfaßt.

4.7 Statistik

4.71 Bestimmung der Signifikanzschwellen für Virustitrationen

Die Bestimmung erfolgte nach den Signifikanztabellen von Lorenz (1960). Sie beträgt bei einem Pipettierfehler von 5% und dem Verdünnungsfaktor 10 bei 4 Reagenten pro Verdünnungsstufe 0,996 für die Unterschiede zweier log ID_{50}. Demnach liegen Titerdifferenzen von weniger als 1 bei einer solchermaßen durchgeführten Virustitration nicht mehr im Bereich der Signifikanz.

4.72 Bestimmung des Interferontiters

Trägt man die Werte der prozentualen Plaquereduktion in einem Koordinatenkreuz gegen die Logarithmen der Interferonverdünnungen auf, so erhält man nach Lindenmann und Gifford (1962) $\int$-förmige Dosiswirkungskurven. Diese Kurven lassen sich mittels der Probit-Analyse in Dosiswirkungskurven von der Form einer Geraden umwandeln (dieselben Autoren).

Im Probitnetz lassen sich durch graphische Schätung die Interferontiter als die 50%ige Plaque-Reduktionsdosis (PDD_{50}) und die zugehörige Standardabweichung direkt bestimmen. Dabei geht man wie folgt vor. Die Probitwerte der prozentualen Plaque-Reduktion (Ordinate) werden in einem Koordinatenkreuz gegen die Logarithmen der Inter-

feronverdünnungen aufgetragen. Die Probitwerte wurden nach den Probittabellen von Finney (1952) bestimmt. Die einzelnen Punkte im Probitnetz wurden durch eine nach Augenmaß geschätzte optimale Gerade verbunden. Sämtliche Geraden einer Versuchsreihe sind Paralellen (Lindenmann und Gifford 1963). Der Interferontiter wird erhalten aus der graphischen Schätzung des Mittelwertes m bei Probitwert 5 auf der Abszisse (Cavalli-Sforza 1964).

4.73 Bestimmung des Signifikanzbereiches des Interferontiters

Der Signifikanzbereich (V) bei 95% Wahrscheinlichkeit für den wahren Mittelwert wird berechnet nach der Formel:

$$V = m \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

m = graphisch geschätzter Mittelwert bei Probitwert 5

t = Signifikanzschwelle nach Student (für 10 Stichproben beträgt t = 2,26)

s = graphisch geschätzte Standardabweichung

n = Stichprobenumfang

Die Standardabweichung (s) kann direkt graphisch geschätzt werden als Differenz der Abszissen der Probitwerte 5 und 6 (Cavalli-Sforza 1964).

5. Versuche und Ergebnisse

5.1 Vergleichende Untersuchungen der Interferonproduktion im Hühnerei durch ei-, saugmaus- und erwachsenenmaus-adaptierte "Plus"- und "Minus"-Stämme.

Für die Untersuchungen wurden die in Tab. 1 aufgeführten Influenza Tübingen/63-Varianten verwendet. Die Interferonaufbereitung der Allantoisflüssigkeit (Pool von je 6 Eiern) erfolgte nach 72stündiger Inkubation des Bruteies bei einem Impftiter von $10^3 EID_{50/ml}$ nach der Präzipitationsmethode von Fantes (1967), wie in Abschnitt 4.51 beschrieben.

Die Interferonverdünnung wurde in einer geometrischen Verdünnungsreihe in Zweierschritten nach der Plaque-Reduktionsmethode (Methodik 4.6) austitriert. Mit jeder Interferonverdünnungsstufe wurden je zwei Platten beschickt.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse wurden in Abb. 2a und Abb. 2b aufgezeichnet. Den Punkten in Abb. 2a liegen die arithmetischen Mittel der Plaque-Zahlen zweier Plastikpetrischalen je Interferonverdünnungsstufe als Plaque-Reduktion in Prozent (gegenüber der Kontroll-Plaque-Zahl von 100%) zugrunde. Um die Ausgleichung der Meßpunkte mittels einer Geraden zu ermöglichen, wurde die prozentuale Plaque-Reduktion nach Finney (1952) ins Probitnetz transformiert und gegen den Zweierlogarithmus der Interferonverdünnung aufgetragen. Diese Methodik ergibt mittels graphischer Abschätzung den Medianwert der Plaque-Reduktion (PDD_{50}) bei Probitwert 5 für jedes Testvirus (vgl. Methodik 4.72).

Die Standardabweichung s von log 2 = 1,7 läßt sich ablesen als Differenz der Abszissenwerte, die den Probitwerten 5 und 6 zugeordnet sind. Der Probitwert 6 entspricht 84% Plaque-Reduktion. Es ergibt sich bei dieser Untersuchung des Hühnereiinterferons eine Standardab-

weichung der Signifikanzschwelle vom Mittelwert um log 2 = ± 1,6 (vgl. Abschn. 4.73 und Abb. 2a).

In Abb. 2c sind die 50%-Plaque-Reduktionsdosen (PDD_{50}) der Interferonverdünnungen, also der Interferontiter für jedes Testvirus in Zweierlogarithmen aufgetragen. Die Säulenhöhe ergibt einen signifikant geringeren Interferontiter bei den adaptierten Eistämmen $E^{(+)}$ und $E^{(-)}$ gegenüber den nicht-adaptierten Mausstämmen $M^{(+)}$ und $M^{(-)}$. Die unterschiedliche Pferde- und Hühnerseruminhibitorempfindlichkeit bei den Ei- und Mausstämmen ergibt keinen signifikanten Unterschied von Virusvermehrung und Interferonproduktion im Brutei. Die um 2 - 3 Zweierlogarithmusstufen geringere Interferonproduktion durch die Eistämme läßt sich nicht auf eine geringere Antigenvermehrung im Brutei zurückführen, wie Abb. 2b zeigt. Die Hämagglutinationstiter als Maß der Antigenvermehrung im Brutei nach 72stündiger Vermehrung zeigen eine 4 - 16fach höhere Virusvermehrung der Eistämme gegenüber den $M^{(+)}$, $M^{(-)}$ und $BM^{(-)}$ Stämmen bezogen auf gleiche Mengen des Ausgangsmaterials. Dies entspricht den bekannten Virulenzunterschieden der Teststämme im Brutei. Der Saugmausstamm $BM^{(-)}$ liegt bezüglich seines Hämagglutinations- und Interferontiters zwischen den Maus- und den Eistämmen.

Abb. 2 d zeigt die Quotienten zwischen den Zweierlogarithmen der hämagglutinierenden Einheiten und den PDD_{50}-Werten der Interferontiter der verwendeten Teststämme. Die Säulenhöhe ist damit ein Maß für die Virusmenge (in HA) je Interferoneinheit (inPDD_{50}). Die Eistämme $E^{(+)}$ und $E^{(-)}$ bilden etwa das 2^5fache an hämagglutinierenden Antigeneinheiten je Interferoneinheit wie die mausadaptierten Stämme und etwa das 2^3fache wie der saugmausadaptierte Stamm. Die unterschiedliche Adaptation der Teststämme an Ei und Maus hat signifikante Unterschiede in der Interferonproduktion zur Folge. Virusvermehrung und Interferonproduktion stehen dabei in reziprokem Verhältnis.

Abb. 2: Vermehrung von Virus und Interferon im Brutei

Abb. 2a: Graphische Bestimmung der Interferontiter der verschiedenen Virusvarianten und der Standardabweichung im Probitnetz.

Abb. 2b: Vergleichende Darstellung der Virustiter

Abb. 2c: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

Abb. 2d: Vergleichende Darstellung der pro Interferoneinheit gebildeten Virusmenge

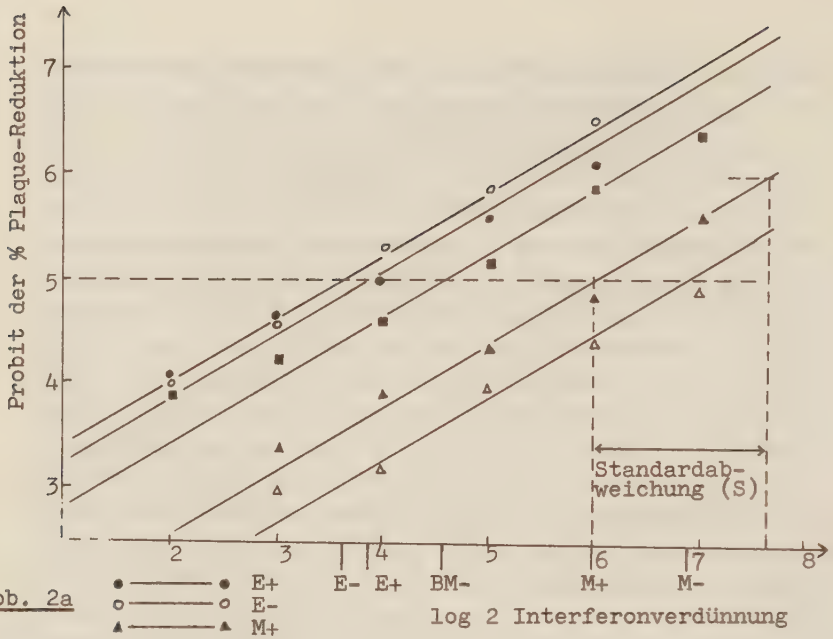

Abb. 2a

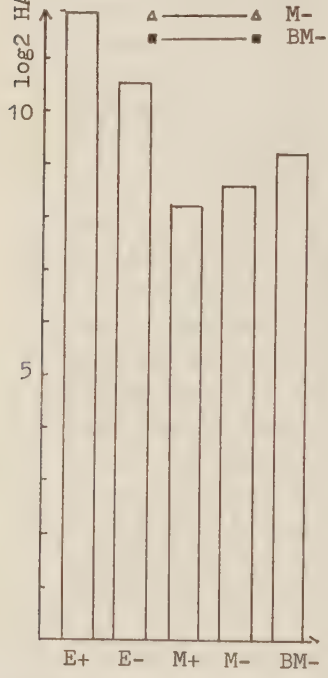

Abb. 2b

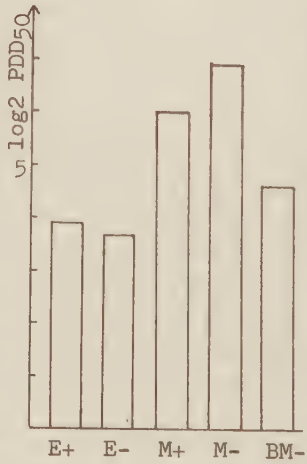

Abb. 2c

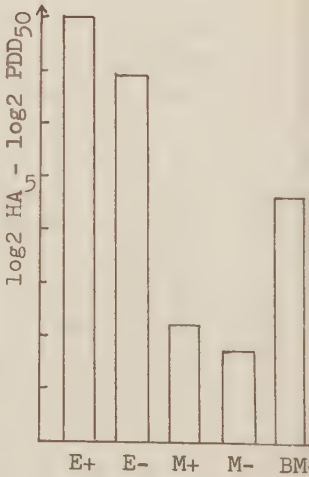

Abb. 2d

Unterschiede der Seruminhibitorempfindlichkeit entsprechen keinen signifikanten Unterschieden des Virus- oder -interferontiters. Der $BM^{(-)}$-Stamm nimmt gegenüber den $E^{(\pm)}$-Stämmen eine Mittelstellung ein.

5.2 Interferonproduktion und Virusvermehrung der Influenzavarianten $E^{(+)}$, $E^{(-)}$, $M^{(+)}$, $M^{(-)}$ und $BM^{(-)}$ in der Saugmauslunge.

Die Virusvermehrung in der Saugmauslunge wurde in Verlaufskurven für die fünf Influenzavarianten in Abb. 3a dargestellt. An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurde Saugmauslungengewebe von je 30 Neugeborenen (nach Infektion mit je 10^4 $EID_{50}/0{,}2$ ml Influenzavirus) homogenisiert unter Zugabe von 80 Gewichtsprozent steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Nach Zentrifugation über eine Stunde bei 2200 g wurde der Überstand bei $-70^{\circ}C$ gelagert. Nach einmaligem Auftauen erfolgte die Schätzung des Virustiters auf Bruteiern in EID_{50}. Die Signifikanzschwelle für die Unterschiede zweier log EID_{50} beträgt für diese Titration 0,996 (vgl. Methodik 4.71).

Die Lungengewichte von 30 Saugmäusen betrugen am 2. Tag der Entnahme ca. 1,8 g und am 4. Tag ca. 2,5 g. Die verwendeten Saugmäuse waren bei der Beimpfung 1 - 2 Tage alt.

Die Lungengewebsextrakte vom 2. und 4. Tag nach Beimpfung wurden zur Interferontitration weiter aufbereitet (vgl. Abschn. 4.53) und in den Abb. 4a und 4e die PDD_{50}-Werte der fünf Interferonverdünnungen im Probitnetz graphisch geschätzt. Die Standardabweichung von log 2 = 1,7 in Abb. 4a hat wegen konstanter Geradensteigerung bei allen Mauslungeninterferondarstellungen für alle Interferontiter Gültigkeit. Es errechnet sich daraus eine Verschiebung der Signifikanzschwelle gegenüber dem graphisch geschätzten Mittelwert der Interferontiter um $\pm$ log 10 = 0,37.

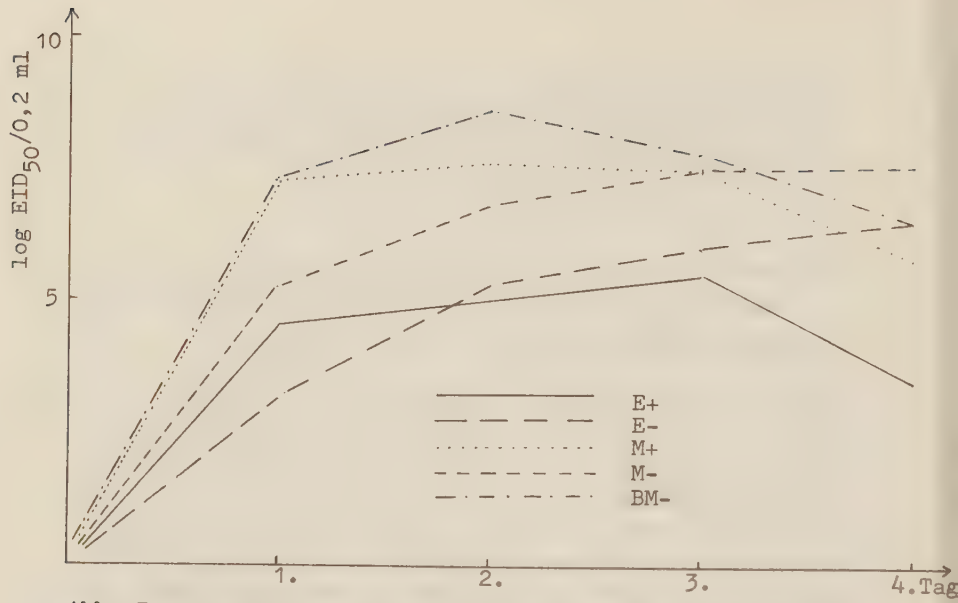

Abb. 3a Vermehrungskurven von Influenza Tübingen/63 Varianten in der Saugmauslunge

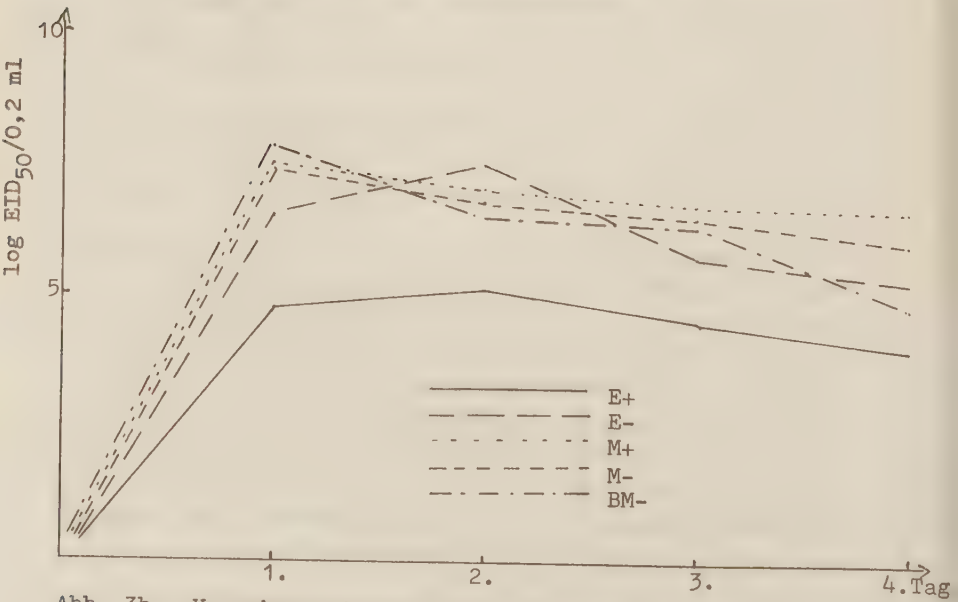

Abb. 3b Vermehrungskurven von Influenza Tübingen/63 Varianten in der Lunge der erwachsenen Maus

Der Signifikanzbereich beträgt somit m $\pm$ 0,37 (vgl. Methodik 4.73).

Die Titrationen des Mausinterferons vom 2. und 4. Tag wurden in zwei verschiedenen Versuchsreihen vorgenommen. Dabei ergab sich eine Titerverschiebung des Standardinterferons um 0,3 Zehnerlogarithmusstufen PDD_{50}. Um die Ergebnisse beider Versuchsreihen vergleichen zu können, wurde dieser Differenzbetrag von den in Abb. 4e und Abb. 5e ermittelten Interferontiterwerten abgezogen.

Ergebnisse:

In Abb. 3a steigen die Virusvermehrungskurven der Varianten $E^{(-)}$ und $M^{(-)}$ kontinuierlich bis zum 4. Tag zu einem Virustiter von $10^{6,5}$ und $10^{7,5} EID_{50}$ an. Die Kurven der Teststämme $BM^{(-)}$ und $M^{(+)}$ erreichen am 2. Tag Titermaxima von $10^{8,5}$ und $10^{7,5}$ EID_{50} und fallen dann am 4. Tag bis zu Werten von $10^{6,5}$ und 10^{6} EID_{50} ab.

Zum besseren Vergleich mit den Interferontitern in den Abb. 4c und Abb. 4g am 2. und 4. Tag erfolgte in den Abb. 4b und Abb. 4f nochmals eine graphische Darstellung der Virustiter des Saugmauslungengewebes vom 2. und 4. Tag. Die genannten Abbildungen zeigen die Zehnerlogarithmen der EID_{50}- und PDD_{50}-Werte an. Abb. 4b zeigt in Korrelation zur Adaptation eine signifikante Virustiterabnahme in der Reihenfolge $BM^{(-)}$, $M^{(\pm)}$, $E^{(\pm)}$ am 2. Tag der Inkubation. Zwischen den beiden Stämmen $E^{(+)}$ und $BM^{(-)}$ ergeben sich sogar Titerunterschiede von $10^{3,5}$ EID_{50}. Die Abb. 4c ergibt signifikante Unterschiede der Interferontiter der $E^{(+)}$- und $E^{(-)}$-Stämme gegenüber den $M^{(+)}$- und $BM^{(-)}$-Stämmen. Eine Ausnahme bildet der $M^{(-)}$-Stamm, dessen Interferontiter signifikant unter dem der $M^{(+)}$- und $BM^{(-)}$-Stämme bleibt.

In Abb. 4d zeigt der Quotient aus Virustiter (in EID_{50}) und Interferontiter (in PDD_{50}) eine deutliche Korrelation zwischen Adaptation an die Saugmauslunge und Interferon-

induktionsfähigkeit. Die erwachsenen- und saugmausadaptierten Stämme bilden um den Faktor $10^{1,6}$ bis $10^{2,6}$ mal mehr Viruseinheiten je Interferoneinheit als die Eistämme. Mit anderen Worten bilden die Stämme mit Adaptation an die Saugmaus und die erwachsenen Maus signifikant weniger Interferon je Viruseinheit als die nicht adaptierten Eistämme.

Zusammenfassend ergibt sich am 2. Tag während der Anstiegsphase sämtlicher Vermehrungskurven eine eindeutige Korrelation zwischen Adaptation, Virustiter und Interferontiter. Diese Tatsache wird jedoch, wie Abb. 4d zeigt, überlagert durch die unterschiedliche Interferoninduktionsfähigkeit der Teststämme. Je besser die Adaptation ist, desto weniger Interferon wird gebildet pro Viruseinheit. Bei den Eistämmen wird eine Interferoneinheit (PDD_{50}) durch 3,5 Viruseinheiten (EID_{50}) induziert. Bei den Mausstämmen ($BM^{(-)}$, $E^{(\pm)}$) sind zur Induktion einer Interferoneinheit 5,2 bis 6,2 Viruseinheiten erforderlich.

Den Vergleich von Virusvermehrung und Interferonproduktion am 4. Tag erlauben die Abb. 3a, Abb. 4e - h.

Die Virusvermehrungskurven zeigen nach den Titermaxima vom 2. und 3. Tag bereits einen deutlichen Titerabfall bei den Stämmen $BM^{(-)}$, $M^{(+)}$ und $E^{(+)}$ gegenüber weiteren Anstiegen beim $E^{(-)}$- und $M^{(-)}$-Stamm. Die Vergleichstiter vom 4. Tag sind in Abb. 4f dargestellt. Die Abb. 4g zeigt die Interferontiter vom 4. Tag in Zehnerlogarithmen der PDD_{50}. Die Mausstämme bilden durchweg um den Faktor $10^{0,8}$ bis 10^{2} mal mehr Interferon als die Eistämme infolge ihrer stärkeren Vermehrung.

Die Differenz von log EID_{50} - log PDD_{50} in Abb. 4h zeigt jedoch eine $10^{1,3}$ bis 10^{2}fach höhere Virusproduktion je Interferoneinheit durch die Mausstämme als durch den $E^{(+)}$-stamm.

Die höhere Interferoninduktion durch die Mausstämme (Abb. 4g) wird also ausschließlich durch die sehr viel

Abb. 4a-d: Vermehrung von Virus und Interferon in der Saugmauslunge am 2. Tag nach Infektion

Abb. 4a: Graphische Bestimmung der Interferontiter der verschiedenen Virusvarianten und der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 4b: Vergleichende Darstellung der Virustiter

Abb. 4c: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

Abb. 4d: Vergleichende Darstellung der pro Interferoneinheit gebildeten Virusmenge

Abb. 4e-h: Vermehrung von Virus und Interferon in der Saugmauslunge am 4. Tag der Infektion

Abb. 4e: Graphische Bestimmung der Interferontiter der verschiedenen Virusvarianten un der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 4f: Vergleichende Darstellung der Virustiter

Abb. 4g: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

Abb. 4h: Vergleichende Darstellung der pro Interferoneinheit gebildeten Virusmenge

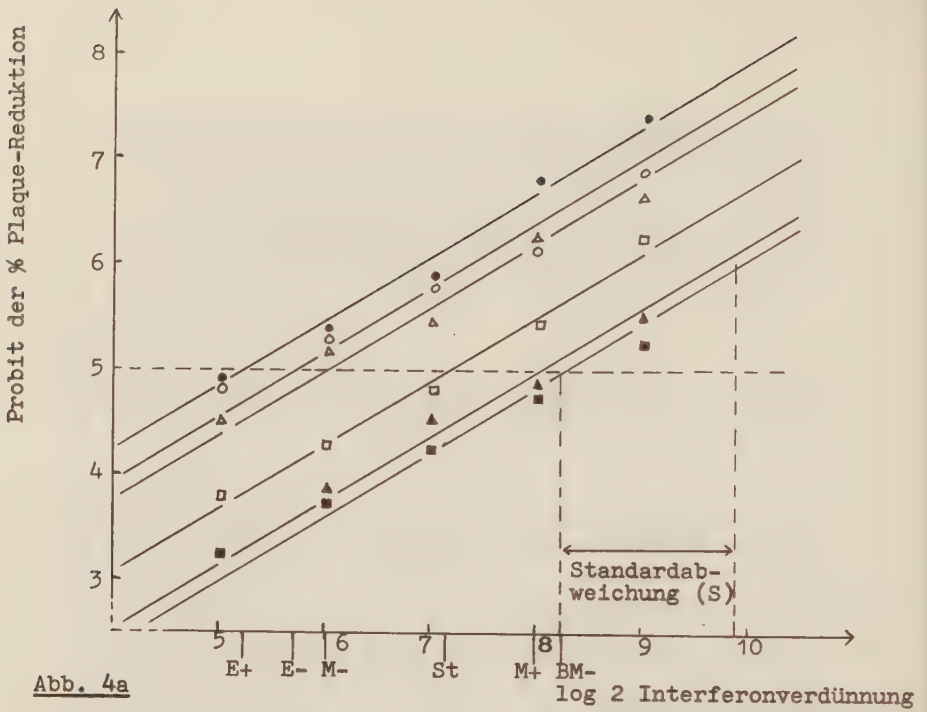

Abb. 4a

E+
E-
M+
M-
BM-
St (Standardinterferon)

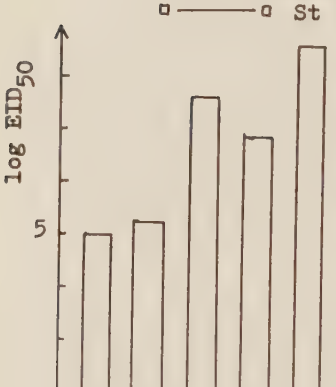

Abb. 4b

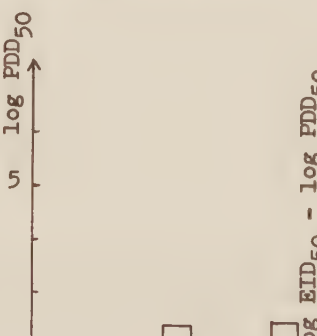

Abb. 4c

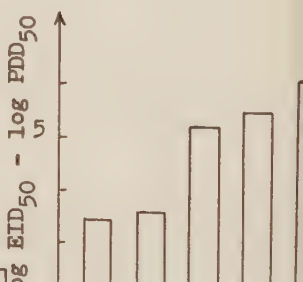

Abb. 4d

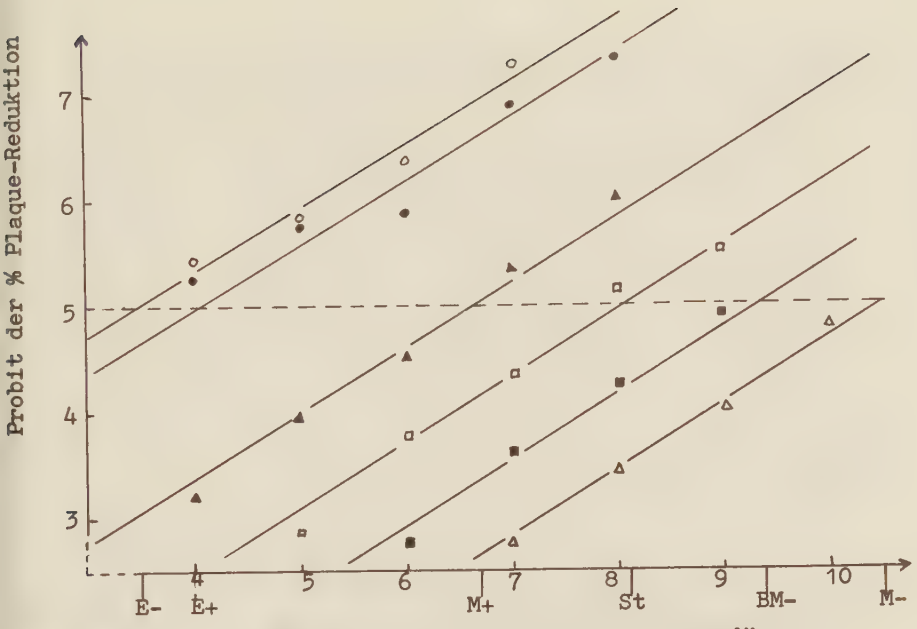

Abb. 4e

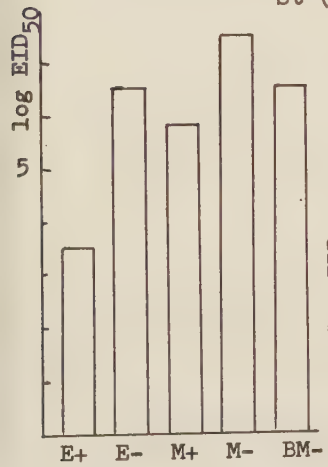

Abb. 4f

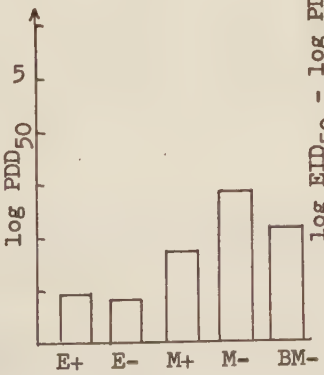

Abb. 4g

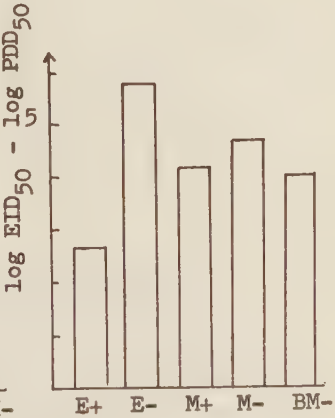

Abb. 4h

höheren Virustiter verursacht. Bei dem $E^{(+)}$-Stamm wird eine Interferoneinheit durch 2,5 Viruseinheiten gebildet, bei den Mausstämmen eine Interferoneinheit durch 4,1 bis 4,6 Viruseinheiten. Der Rückgang des Quotienten log EID_{50} - log PDD_{50} am 4. Tag gegenüber dem 2. Tag der Inkubation (vgl. Tab.2) deutet auf Zusammenhänge zwischen Interferonwirkung und Virusreplikation im Saugmauslungengewebe hin.

Der $E^{(-)}$-Stamm fällt dabei am 4. Tag bezüglich Virustiter und Interferonproduktion aus dem Rahmen. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens wäre, daß der langsame Virustiteranstieg auf geringe Titerhöhe (s. Abb. 3a) nur eine geringe Interferonproduktion induziert und damit einen hohen Virus/Interferonquotienten.

Beim $M^{(-)}$-Stamm geht die kontinuierliche Virusvermehrung bis zum 4. Tag mit steigender Interferonproduktion parallell im Gegensatz zum $E^{(-)}$-Stamm. Möglicherweise spielt also die Anstiegsgeschwindigkeit des Virustiters für die Interferonproduktion eine zusätzliche Rolle.

Ein weiteres Kriterium ist die absolute Virustiterhöhe. Ihr kommt für die Höhe der Interferonproduktion zusätzliche Bedeutung zu. Die Virustiter vom $M^{(-)}$-Stamm liegen am 2. und 4. Tag um $10^{1,5}$ EID_{50} höher als beim $E^{(-)}$-Stamm.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Adaptation der Influenza-Tübingen/63-Varianten bei der Saugmaus am 2. und 4. Tag korreliert mit der Virusproduktion je Interferoneinheit, lediglich der $E^{(-)}$-Stamm verhält sich dazu am 4. Tag atypisch.

5.3 Vergleich der Virusvermehrung und Interferonproduktion der Influenzastämme in der Lunge der erwachsenen Maus mit den Ergebnissen in der Saugmauslunge.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden je 10 erwachsene Mäuse im Alter von 4 - 6 Wochen mit je 10^6 $EID_{50/0,2\ ml}$ intranasal beimpft. Das Lungengewebe von je

Abb. 5a-d: Vermehrung von Virus und Interferon in der Lunge der erwachsenen Maus am 2.Tag nach Infektion

Abb. 5a: Graphische Bestimmung der Interferontiter der verschiedenen Virusstämme und der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 5b: Vergleichende Darstellung der Virustiter

Abb. 5c: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

Abb. 5d: Vergleichende Darstellung der pro Interferoneinheit gebildeten Virusmenge

Abb. 5e-h: Vermehrung von Virus und Interferon in der Lunge der erwachsenen Maus am 4.Tag nach Infektion

Abb. 5e: Graphische Bestimmung der Interferontiter der verschiedenen Virusstämme und der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 5f: Vergleichende Darstellung der Virustiter

Abb. 5g: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

Abb. 5h: Vergleichende Darstellung der pro Interferoneinheit gebildeten Virusmenge

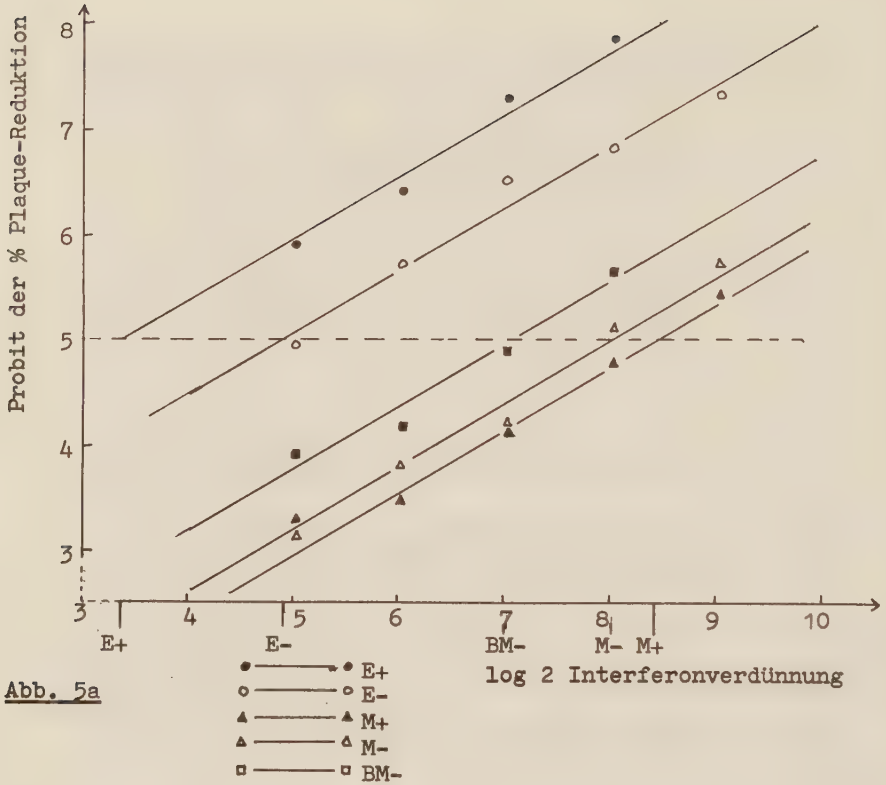

Abb. 5a

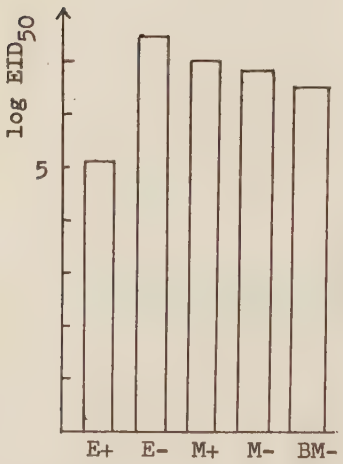

Abb. 5b

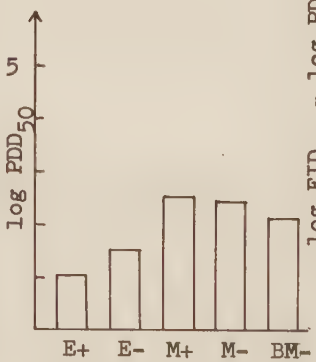

Abb. 5c

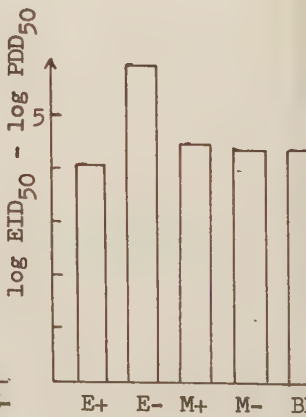

Abb. 5d

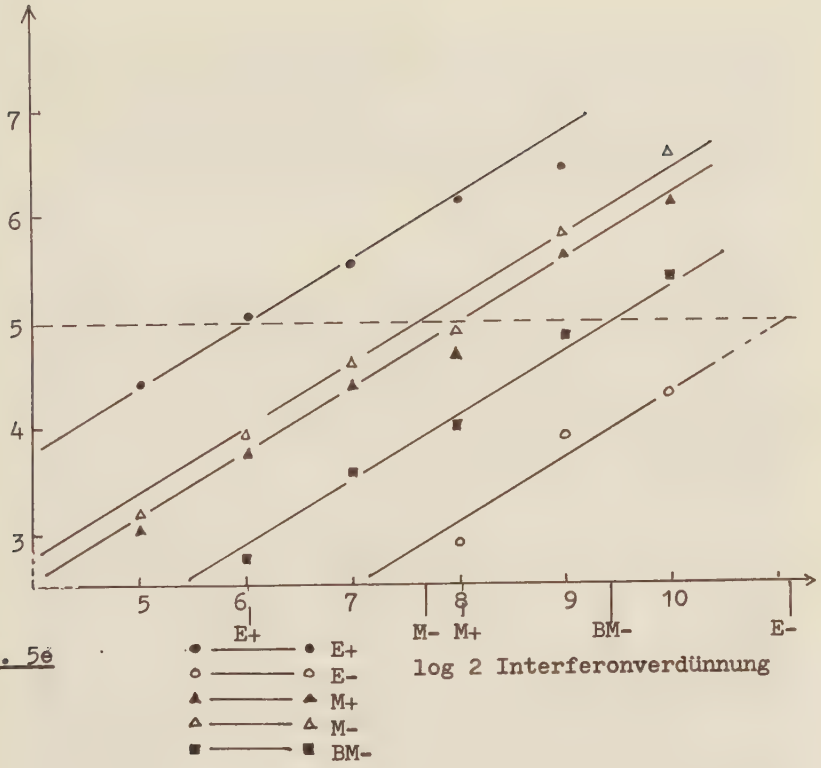

Abb. 5e

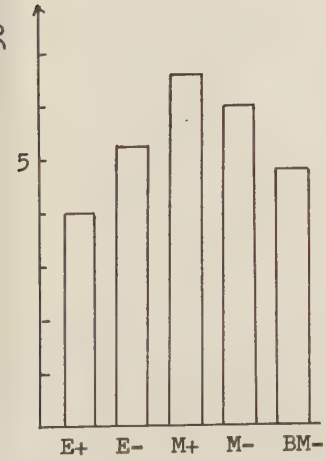

Abb. 5f

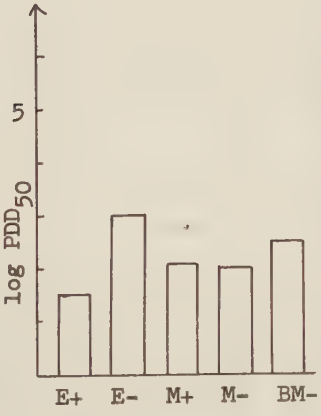

Abb. 5g

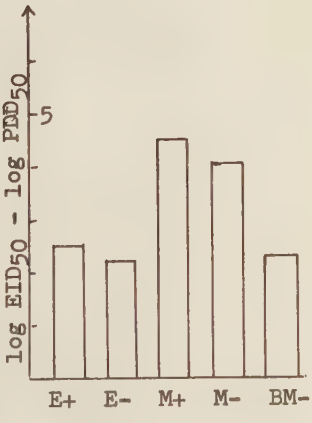

Abb. 5h

10 Tieren (ca. 2,5 g) wurde in Glasmörsern mit 80 Gewichtsprozenten PBS-Salzlösung homogenisiert und wie das Saugmauslungengewebe weiter aufbereitet (vgl. Abschn. 4.53). Der Virustiter wurde täglich über 4 Tage, der Interferontiter nach 48 und 96 Stunden bestimmt.

Ergebnisse:

Die Abb. 3b zeigt die Virusvermehrungskurven der Teststämme in der Lunge der Maus. Der Virustiter steigt bei den mausadaptierten Stämmen $BM^{(-)}$ und $M^{(\pm)}$ bereits am 1. Tag zu Titermaxima von $10^{7,5}$ bis $10^{7,8}$ EID_{50} an. Darauf fällt die Vermehrungskurve langsam ab um 1 -3 Titerstufen log 10 EID_{50}.

Die nicht adaptierten Eistämme zeigen am 2. Tag ihre Titermaxima bei $10^{7,5}$ EID_{50} ($E^{(-)}$-Stamm) und 10^{5} EID_{50} ($E^{(+)}$-Stamm). Der Pferde- und Hühnerseruminhibitor-empfindliche Stamm zeigt im Vergleich zum Inhibitor-unempfindlichen Stamm eine wesentlich flachere Vermehrungskurve.

Die Abb. 5b zeigt die Virustiter des zweiten Tages mit $10^{1,5}$ - 10^{2} EID_{50} Titerunterschied des $E^{(+)}$-Stammes gegenüber den Mausstämmen. Der $E^{(+)}$-Stamm vermehrt sich langsamer und geringer als der $E^{(-)}$-Stamm, zeigt jedoch am 2. Tag wie dieser sein Titermaximum. Die nach der Probitanalyse bestimmten Interferontiter in Abb. 5c zeigen $10^{0,6}$ bis $10^{1,5}$fach höhere Werte für die Mausstämme als für die Eistämme. Die Titerunterschiede innerhalb der Mausstämme und innerhalb der Eistämme liegen am Rand des Signifikanzbereiches und sind nicht verwertbar.

Das Verhältnis von Viruseinheit zu Interferoneinheit am 2. Tag zeigt Abb. 5d. Sämtliche Stämme mit Ausnahme des $E^{(-)}$-Stammes, der sich hier wieder atypisch verhält, zeigen keine signifikanten Unterschiede. Der $E^{(-)}$-Stamm bildet um den Faktor 10^{2}mal mehr Virus je Interferoneinheit als der $E^{(+)}$-Stamm. Diese Unterschiede erklären sich möglicherweise gegenüber dem $E^{(+)}$-Stamm durch den rascheren Virustiteranstieg und das höhere Titermaximum und

gegenüber den Mausstämmen durch die Tatsache des Titeranstiegs bis zum 2. Tag gegenüber dem Titerabfall bei den Mausstämmen bereits nach dem 1. Tag.

Die Abbildungen 5f und 5g zeigen das Verhalten von Virus- und Interferontiter in der Mauslunge nach 4tägiger Inkubation.

Der $E^{(+)}$-Stamm zeigt gegenüber dem $M^{(+)}$- und $M^{(-)}$-Stamm einen Virustiterunterschied von 10^2 - $10^{2,5}$ EID_{50}. Die Titerdifferenz des $E^{(+)}$-Stammes gegenüber dem $BM^{(-)}$-Stamm liegt nicht im Signifikanzbereich.

Abb. 5g zeigt die signifikant höheren Interferontiter der mausadaptierten Stämme gegenüber dem $E^{(+)}$-Stamm. Der $E^{(-)}$-Stamm zeigt mit einem log PDD_{50}-Wert von 3,0 den höchsten Interferontiter.

Abb. 5h zeigt die mehrfach höhere Virusproduktion der Mausstämme $M^{(+)}$ und $M^{(-)}$ je Interferoneinheit gegenüber den Ei- und BM-Stämmen.

Die Adaptation korreliert am 4. Tag nach Inkubation und 2 bis 3 Tage nach dem Gipfel der Vermehrungskurve bei der erwachsenen Maus signifikant mit der zur Bildung einer Interferoneinheit benötigten Virusmenge; d.h. je weniger adaptiert ein Stamm ist, oder je niedriger der Titer des Virus ist, desto weniger Virus wird benötigt, um eine Interferoneinheit zu induzieren. Der $BM^{(-)}$-Stamm verhält sich dabei wie eine nicht adaptierte Variante.

Vergleich der Ergebnisse
mit den Untersuchungen in der Saugmaus:

Der Vergleich der Parameter Virusvermehrung und Interferonproduktion bei der erwachsenen Maus mit denen der Saugmaus ist möglich, da sich die Werte auf gleiche Gewichtseinheiten Lungengewebe beziehen.

Die Virustitermaxima bei der Saugmaus liegen bei $10^{8,5}$ EID_{50} für den bestadaptierten $BM^{(-)}$-Stamm, die Gipfelminima bei $10^{5,5}$ EID_{50} für den nicht adaptierten

Tabelle 2

Vergleichende Darstellung von Virustiter, Interferontiter und Virusmenge je Interferoneinheit im Brutei, der Lunge von Saugmaus und erwachsener Maus

	Stämme	Brutei	Saugmauslungengewebe				Lungengewebe d.erw. Maus			
		76 Std.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Virustiter (im Brutei log 2 HA; Mauslunge log EID_{50})	E+	11,9	4,5	5	5,5	3,5	4,8	5,1	4,5	4,0
	E-	10,55	3,1	5,25	6,0	6,5	6,5	7,5	5,7	5,25
	M+	8,2	7,25	7,6	7,5	5,8	7,5	7,0	6,7	6,6
	M-	8,6	5,25	6,8	7,5	7,5	7,5	6,8	6,5	6,0
	BM-	9,25	7,25	8,6	7,8	6,5	7,8	6,5	6,3	4,8
Interferontiter (Brutei log 2 PDD_{50} Mauslunge log PDD_{50}	E+	3,9		1,56		0,9		1,0		1,5
	E-	3,65		1,71		0,75		1,5		3,0
	M+	6,0		2,4		1,7		2,5		2,1
	M-	6,9		1,8		2,85		2,4		2,0
	BM-	4,6		2,48		2,13		2,1		2,5
Virus pro Interferoneinheit (Brutei log2 HA : log2 PDD_{50} Mauslunge log EID_{50} : log PDD_{50})	E+	8,0		3,44		2,6		4,1		2,5
	E-	6,9		3,54		5,75		6,0		2,2
	M+	2,2		5,2		4,1		4,5		4,5
	M-	1,7		5,5		4,65		4,4		4,0
	BM-	4,65		6,12		4,0		4,4		2,3

$E^{(+)}$-Stamm. Die Scheitelpunkte der Vermehrungskurven variieren je nach Stamm um maximal 10^3 EID_{50}. Sie werden vom 2. bis 4. Tag erreicht. Die Kurvenmaxima bei der erwachsenen Maus variierten zwischen 10^5 ($E^{(+)}$-Stamm) und $10^{7,8}$ ($BM^{(-)}$-Stamm). Sie wurden am 1. Tag ($M^{(+)}$, $M^{(-)}$, $BM^{(-)}$) und am 2. Tag ($E^{(+)}$, $E^{(-)}$) nach Impfung erreicht, also durchschnittlich 24 bis 48 Stunden früher als bei der Saugmaus. Dies erklärt sich zum größten Teil daraus, daß die Impfdosis bei den Saugmäusen um den Faktor 10^1 - 10^2 geringer war als bei den erwachsenen Mäusen. Die Interferontiter bei der Saugmaus schwanken am 2. Tag zwischen den log PDD_{50}-Werten von 1,6 bis 2,5 und 0,9 bis 2,9 (4. Tag). Bei der erwachsenen Maus liegen die Werte zwischen 1 und 2,5 (2. Tag) und 1,5 und 3,0 (4. Tag). Die Interferonbildungsfähigkeit ist also in beiden Lebensaltern der Maus bezüglich Anstiegsgeschwindigkeit und Maximum der Interferontiter etwa gleich groß. Ebenso werden in beiden Lebensaltern in Abhängigkeit von der Adaptation etwa gleich hohe Virustitermaxima erreicht. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die pro Interferoneinheit produzierte Virusmenge in der Lunge von Maus und Saugmaus in den ersten Tagen nach der Infektion durchschnittlich paralell der Adaptation der Teststämme geht. Der $E^{(-)}$-Stamm verhält sich dazu mehrfach atypisch. Mögliche Gründe für dieses Verhalten der Teststämme werden unter Abschnitt 64 und 65 der Diskussion besprochen.

5.4 Vergleich der Interferonproduktion in Zellkulturen im Kreuzversuch mit Hühner- und Mäuseembryofibroblasten durch ei- und mausadaptierte Influenzastämme bei hohem Impftiter

Bei diesen Untersuchungen fanden Mausembryofibroblastenkulturen von 20tägigen Embryonen nach 5tägigem Wachstum bei einmaligem Mediumwechsel zur Interferonproduktion Verwendung (vgl. Methodik 4.42 und 4.54).

Die Hühnerembryofibroblastenkulturen wurden nach der unter 4.41 beschriebenen Methode hergestellt. Die Zellrasen waren nach zwei Tagen dicht.

Von beiden Zellkulturen wurden pro Virusstamm je 5 Petrischalen nach zweimaligem Spülen mit Hanks' Salzlösung mit je 0,2 ml Virussuspension des konstanten Titers von 10^8 $EID_{50/0,2\ ml}$ beimpft und das Impfmaterial eine Stunde bei 37°C adsorbiert. Nach Zugabe von Anwachsmedium wurde in PVC-Röhren mit 5% CO_2 Gas bei 37°C inkubiert, danach das interferonhaltige Medium gepoolt und wie unter Abschnitt 4.54 beschrieben, weiterverarbeitet.

Je 2 Platten Hühnerfibroblastenkulturen wurden über Nacht mit je 4 ml Interferonverdünnung beschickt und der Interferontiter nach der Plaque-Reduktionsmethode bestimmt (vgl. Abschn. 4.6). Ziel dieser Versuche war es, die Interferoninduktionsfähigkeit der verschiedenen Influenzastämme in den embryonalen Zellkulturen mit den Ergebnissen im Gesamtorganismus von erwachsener Maus, Saugmaus und Brutei zu vergleichen.

Ergebnisse:

Interferon aus Hühnerembryofibroblastenkulturen:

Im Diagramm der Abb. 6a bedeutet jeder Punkt das arithmetische Mittel der prozentualen Plaque-Reduktion zweier Testplatten pro Verdünnungsstufe Interferon, aufgetragen in Zweierlogarithmen. Die Ordinatenwerte sind ins Probitnetz übertragen.

Die Abb. 6b zeigt die Interferontiter der Teststämme. Der Vertrauensbereich beträgt bei diesem Versuch log 2 = $\pm$ 1,08 (vgl. Methodik 4.73). Die Interferontiter der Eistämme liegen um 1,7 ("Plus"-Stämme) und 3,4 ("Minus"-Stämme) Zweierlogarithmusstufen unter dem Titer der Mausstämme. Der Saugmausstamm verhält sich bezüglich der Interferonproduktion wie ein Eistamm.

Bezüglich der Inhibitorempfindlichkeit der Ei- und Maus-

stämme gibt es keine signifikanten Titerunterschiede. Bei den beimpften Zellkulturen dürfte es zu keiner nennenswerten Virusproduktion gekommen sein. Im Nährmedium war nach 5tägiger Inkubation auch keine Hämagglutination nachweisbar. Bei der Virusproduktion in den HEF-Kulturen spielt möglicherweise der Interferongehalt des aus dem Brutei stammenden Impfmaterials eine gewisse Rolle.

Die Impftiter der Stämme $E^{(+)}$, $M^{(-)}$ und $BM^{(-)}$ wurden eingestellt auf 10^{8} $EID_{50/0,2\ ml}$ und betrugen beim $E^{(-)}$-Stamm nur $10^{7,75}EID_{50/0,2\ ml}$ und beim $M^{(+)}$-Stamm $10^{7,8}$ $EID_{50/0,2\ ml}$. Diese Titerunterschiede liegen im Bereich der Fehlerbreite.

Die unterschiedlichen Interferontiter sind vermutlich im wesentlichen Ausdruck der differierenden Interferoninduktionsfähigkeit der Teststämme.

In Übereinstimmung mit den In-Vivo-Versuchen im Brutei wurden durch die besser adaptierten und sich im Brutei besser vermehrenden Eistämme $E^{(+)}$ und $E^{(-)}$ auch in HEF-Zellkulturen geringere Interferontiter induziert als durch die $M^{(+)}$ und $M^{(-)}$-Stämme. Der $BM^{(-)}$-Stamm verhält sich dabei wie ein Eistamm.

Abb. 6: Interferonbildung in Zellkulturen von Hühnerembryofibroblasten bei gleichem Impftiter der verschiedenen Influenzavarianten

Abb. 6a: Graphische Bestimmung der Interferontiter und der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 6b: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

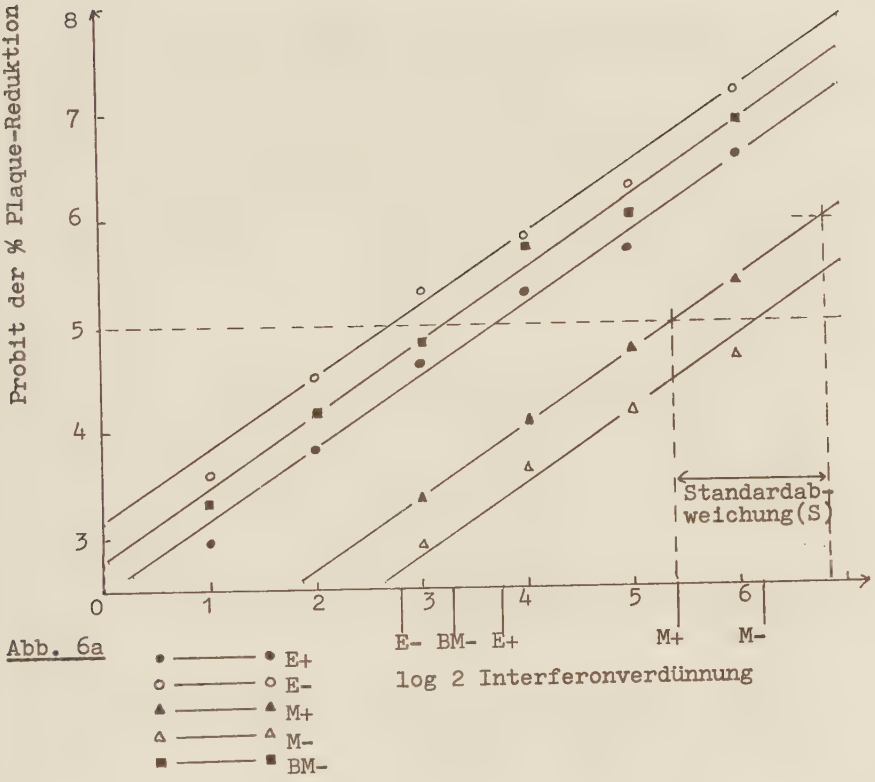
Probit der % Plaque-Reduktion
8
7
6
5
4
3
0
1
2
3
4
5
6
Standardabweichung(S)
E- BM- E+
M+
M-
log 2 Interferonverdünnung
E+
E-
M+
M-
BM-

Abb. 6a

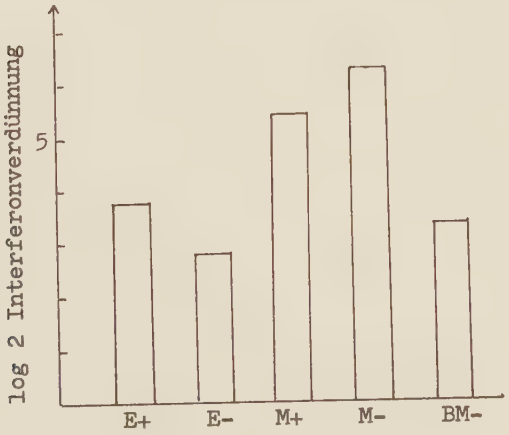
log 2 Interferonverdünnung
5
E+
E-
M+
M-
BM-

Abb. 6b

Interferon aus Mäuseembryofibroblasten:

Die Abb. 7b zeigt die aus Abb. 7a ermittelten Interferontiter im Zweierlogarithmus. Die Titer der Mausstämme unterscheiden sich von den Titern der Eistämme um log 2 = 2,0 PDD_{50} bei den seruminhibitorunempfindlichen Teststämmen und um log 2 = 5,6 PDD_{50} bei den seruminhibitorempfindlichen $E^{(+)}$- und $M^{(+)}$-Stämmen. Der $BM^{(-)}$-Stamm bildet um log 2 = 3,4 PDD_{50} weniger Interferon als der $M^{(-)}$-Stamm.

Bezieht man diese Ergebnisse auf den gleichen Impftiter (ca. 10^8 EID_{50}/0,2 ml), so ergibt sich für die adaptierten Mausstämme $M^{(+)}$ und $M^{(-)}$ eine signifikant höhere Interferonproduktion als für die Stämme $E^{(+)}$, $E^{(-)}$ und $BM^{(-)}$. Der $E^{(-)}$-Stamm bildet gegenüber dem $E^{(+)}$-Stamm um ca. 3,5 Titerstufen log 2 PDD_{50} mehr Interferon. Hierbei spielt möglicherweise die unterschiedliche Mucoproteinempfindlichkeit bei der Adsorption an die Zellwand eine Rolle.

Während bei den Stämmen $M^{(+)}$ und $M^{(-)}$ die Adaptation positiv mit der Interferonproduktion korreliert, verhält sich der $E^{(-)}$-Stamm atypisch.

Abb. 7: Interferonbildung in Zellkulturen von Mäuseembryofibroblasten bei gleichem Impftiter der verschiedenen Influenzavarianten

Abb. 7a: Graphische Bestimmung der Interferontiter und der Standardabweichung im Probitnetz

Abb. 7b: Vergleichende Darstellung der Interferontiter

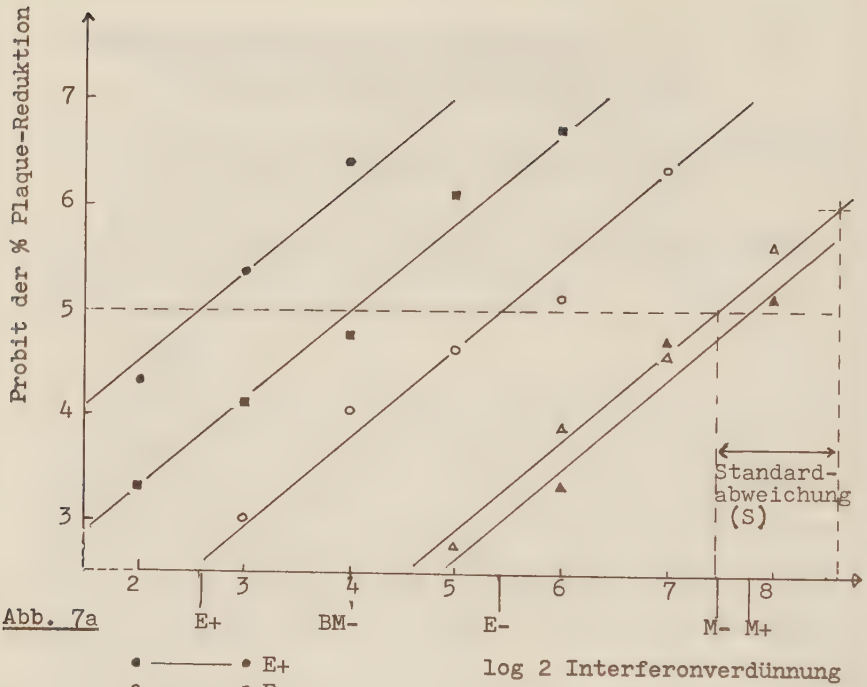
Probit der % Plaque-Reduktion
7
6
5
4
3
2
3
4
5
6
7
8
Standard-
abweichung
(S)
E+
BM-
E-
M-
M+
log 2 Interferonverdünnung
E+
E-
M+
M-
BM-

Abb. 7a

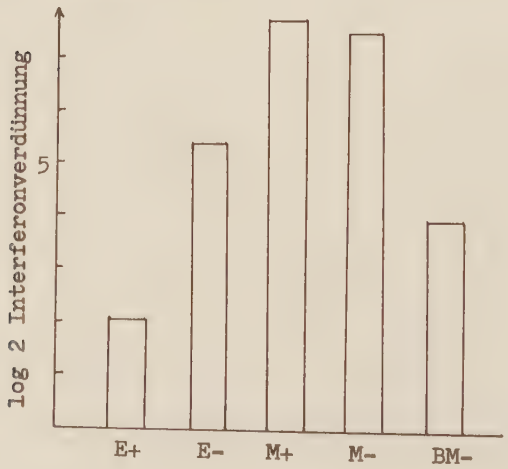
log 2 Interferonverdünnung
5
E+
E-
M+
M-
BM-

Abb. 7b

6. Diskussion

6.1 Zusammenhänge zwischen Interferontitrationszeitpunkt, Virusvermehrung und Antikörperbildung in der Mauslunge

Die Ergebnisse der Versuche zeigen am 2. und am 4. Tag bei der Saugmaus und erwachsenen Maus, nach 72 Stunden im Brutei und nach fünf Tagen in den Zellkulturen ausreichend hohe und deutlich differierende Interferontiter. Die Titrationszeitpunkte des Interferons fallen im wesentlichen bei Maus und Saugmaus am 2. Tag mit den Gipfeln der Virusvermehrungskurven und am 4. Tag mit dem abfallenden Schenkel der Virusvermehrungskurven zusammen.

In der Arbeit "Multiplication of mouse-adapted influenzavirus in mouse lungs after infection with very low dosis" von Link und Raus (1961) zeigten sich in Virustiterverlaufsbeobachtungen über 15 Tage Titeranstieg bzw. Titermaximum am 2. - 3. Tag. Am 4. - 5. Tag nach der Infektion zeigte sich eine erste Virustiterreduktion oder das völlige Verschwinden eines nachweisbaren Virustiters in allen Experimenten. Virusneutralisierende Antikörper wurden im Mausserum innerhalb der ersten 10 Tage nicht nachgewiesen. Isaacs und Hitchcock stellten 1960 in der Mauslunge nach Infektion mit Influenza PR8-Stamm maximale Interferontiter am 2. Tag und rückläufige Interferontiter am 4. Tag parallel zur Virusvermehrungskurve fest.

Im Gegensatz dazu stellen Baron und Buckler mit dem PR8-Stamm am 2. Tag nach Infektion bei Virustitermaxima von 10^8 sehr niedrige Interferontiter fest und maximale Interferontiter am 4. Tag nach deutlichem Virustiterabfall.

Isaacs und Hitchcock (1960) erhielten jedoch bei Infektion der Mauslunge mit dem PR8-Stamm am 2. und 4. Tag hohe Virustiter und damit korrespondierende hohe Interferontiter. Antikörper konnten dabei innerhalb der ersten 7 Tage der Infektion nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3

Vergleich der Virus- und Interferonproduktion bei der erwachsenen Maus und der Saugmaus aus Untersuchungen verschiedener Autoren:

Autor	Virus	Gewebe	Titer (a)		Saugmaus 2.Tag	Saugmaus 4.Tag	erwachs.Maus 2.Tag	erwachs.Maus 4.Tag
eigene Untersuchgn.	Influenza H2N2	Maus-lunge	Virus	log EID_{50}(b)	6,6	6,0	6,5	5,3
			Interferon	log PDD_{50}(b) bez.auf Organgewicht	2	1,66	1,9	2,2
Sawicki (e)	Sendai	Maus-lunge	Virus	log ID_{50}	5,0	4,7	3,6	3,5
			Interferon	log PDD_{50} bez.auf Organgewicht	2,1	1,4	2,2	2,6
Craig-head (e)	Para-influenza-Typ 3	Maus-lunge	Virus	log ID_{50}	5,8	5,0	3,2	0,4
			Interferon	Einheiten PDD je Gesamtlunge	10	10	5	0
Heine-berg et al.	Cock-sackie B2	Leber Hirn Muskel Niere	Virus	log TC ID (c)	6,1	6,0 (d)	6,0	4,6(d)
			Interferon	log PDD (c) bez.auf g Organgewicht	0,36	0,44 (d)	1,6	2,6(d)

(a) Die Titerangaben sind keine Absolutwerte. Sie lassen sich wegen der unterschiedlichen Meßverfahren nur bedingt vergleichen.
(b) arithmet. Mittel von 5 Teststämmen
(c) arithmet. Mittel der einzelnen Organgewebstiter
(d) Diese Titer beziehen sich auf den 3. Tag nach Infektion
(e) Die Titerwerte wurden aus den Verlaufskurven o.g. Autoren geschätzt

Die Interferonproduktion geht in unseren Versuchen weitgehend paralell der Virusvermehrung am 2. Tag. Bei den Verlaufsuntersuchungen von Virus- und Interferontiter in der erwachsenen Maus und in der Saugmaus verhalten sich am 4. Tag die 5 Stämme recht unterschiedlich. Die Virustiter sind in 8 von 10 Fällen rückläufig, die entsprechenden Interferontiter in 5 Fällen gleichfalls rückläufig, in 3 Fällen steigen sie an. In einem Fall kommt es trotz Abfall des Virustiters zu weiterem Anstieg des Interferontiters, in einem anderen steigen Virus- und Interferontiter an.

6.2 Vergleich der Interferonbildungsfähigkeit in der Lunge von Saugmaus, erwachsener Maus und in Zellkulturen

Die Untersuchungen der erwachsenen Maus- und der Saugmauslunge ergeben keine wesentlichen Unterschiede in der Interferonproduktionsfähigkeit. Dieser Vergleich ist hier möglich, da die Lungengewebe jeweils mit gleichen Gewichtsprozenten PBS-Salzlösung aufgearbeitet wurden. In unseren Versuchen erreicht das Mauslungengewebe Virustiter von $10^{7,8}$ EID_{50} und Interferontiter von $10^{3,0}$ PDD_{50}. In der Saugmauslunge wurden Virustiter von $10^{8,5}$ EID_{50} und Interferontiter von $10^{2,85}$ PDD_{50} erreicht.

Eine Übersicht über die unterschiedliche Interferonproduktion bei der Saugmaus und der erwachsenen Maus in Abhängigkeit vom Virustiter bei verschiedenen Virusarten gibt Tab. 3.

Mehrere Autoren berichteten von einer geringeren Interferonproduktion bei Saugmäusen. Sawicki stellte 1961 bei intranasaler Sendai-Virusinfektion von Mäusen bei Neugeborenen ab dem 3. Tag trotz höherer Virustiter geringere Interferontiter fest als bei den erwachsenen Mäusen. Heineberg und Mitarbeiter (1964) kommen zu ähnlichen Versuchsergebnissen mit Cocksacki-B1-Infektion von Mäusen bei der Untersuchung von 5 verschiedenen Organen. Craighead

stellte 1966 bei intranasaler Impfung mit Parainfluenza-Virus Typ 3 jedoch bei Saugmäusen höhere Interferontiter fest als bei erwachsenen Mäusen bei gleichzeitig höheren Virustitern.

Die Interferonbildungsfähigkeit in den Embryonalzellkulturen von Maus und Huhn differieren geringfügig um 1,5 Zweierlogarithmusstufen des Interferontiters. Der Grund liegt vermutlich in den Unterschieden der Virusadsorption und -replikation bei Zellkulturen verschiedener Wirte.

6.3 Zusammenhänge zwischen Virusvermehrung, Adaptation und Virulenz

Die Untersuchungen im Brutei, in der Saugmauslunge am 2. und am 4. Tag und in der Lunge der erwachsenen Maus zeigen weitgehend eine Paralellität zwischen Virusvermehrung und Adaptation. Eine Ausnahme bildet der $E^{(-)}$-Stamm in der Saugmauslunge am 4. Tag und in der Lunge der erwachsenen Maus am 2. und am 4. Tag, in der sich der $E^{(-)}$-Stamm wie ein Mausstamm vermehrt.

Der $BM^{(-)}$-Stamm vermehrt sich zwar in der Saugmauslunge am besten, verhält sich jedoch in der Lunge der erwachsenen Maus wie ein M-Stamm.

Die adaptierten Stämme ($M^{(+)}$, $M^{(-)}$ und $BM^{(-)}$) zeigen in den Vermehrungskurven in Abb. 2a und Abb. 2b in der erwachsenen Maus und in der Saugmaus durchschnittlich eine schnellere Anfangsvermehrung und erreichen höhere Virustiter als die Eistämme. Die Eistämme erreichen jedoch erwartungsgemäß im Brutei gegenüber den mausadaptierten Stämmen die höheren Virustiter. Zwischen der Virusvermehrung und der Virulenz läßt sich, wie McLaren und Potter (1970) zeigten, keine eindeutige Beziehung bei den von ihnen untersuchten zehn Influenzastämmen herstellen. Die Virulenz, gemessen an der Fähigkeit, Lungenläsionen zu produzieren bzw. Mäuse zu töten, korrelierte zwar meist mit hohen Virustitern, jedoch ging auch in einzelnen Fällen geringe Virulenz mit hohen Virustitern einher.

Die Virulenz eines Virus für den Wirtsorganismus ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Einerseits antwortet der Organismus auf eine Virusinfektion mit einem komplexen Zusammenspiel von zellulären und humoralen Abwehrmechanismen, einschließlich des Interferons zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (Glasgow 1970), andererseits spielen Viruseigenschaften, wie Vermehrungsgeschwindigkeit (Kendal und Allan, 1970) und die Hemmung der Synthesevorgänge in der Wirtszelle (Wertz und Younger 1970)

eine entscheidende Rolle.

Berücksichtigt man die oben genannten Ausnahmen in diesen Versuchen, dann geht die Virusvermehrung bei den hier verwendeten Teststämmen und Wirtsorganismen der Adaptation paralell.

6.4 Korrelation zwischen Virusvermehrung, Adaptation und Interferonproduktion im Gesamtorganismus und in Zellkulturen

Im Brutei korreliert nach 76stündiger Inkubation gute Virusvermehrung der Eistämme (bzw. Vermehrung der hämagglutinierenden Einheiten) mit niedriger Interferonproduktion und niedrige Virusvermehrung der $M^{(+)}$, $M^{(-)}$- und $BM^{(-)}$-Stämme mit hoher Interferonproduktion. Bezieht man die Virustiter der Teststämme (in HA) auf eine Interferoneinheit, so ergibt sich, daß die adaptierten Eistämme zum Titrationszeitpunkt je Interferoneinheit mehr Virus gebildet haben als die Mausstämme. Mit anderen Worten, die adaptierten Stämme bilden weniger Interferon je hämagglutinierende Einheit des Testvirus als die nicht adaptierten. Im Gegensatz zu den Verhältnissen im Brutei gehen die Interferontiter in der Lunge der erwachsenen Maus und der Saugmaus den Virustitern grob quantitativ paralell. Der $E^{(-)}$-Stamm zeigt bei der Saugmaus am 4. Tag und bei der erwachsenen Maus am 2. Tag dazu atypisches Verhalten, indem er bei einem sehr hohen Virustiter extrem wenig Interferon induziert. Berechnet man für jedes Testvirus die pro Interferoneinheit gebildete Virusmenge, so ergibt sich, daß die grob quantitative Paralellität zwischen Virusvermehrung und Interferonproduktion in Maus und Saugmaus überlagert ist von einer für jedes Testvirus verschiedenen Korrelation zwischen Virus- und Interferonmenge. Diese Korrelation ist abhängig von der Adaptation des Testvirus, von der Art des Wirtsorganismus und vom Titrationszeitpunkt.

Die Untersuchungen im Brutei, in der Saugmauslunge am 2. und am 4. Tag nach Infektion und in der Lunge der erwachsenen Maus am 4. Tag und in den Hühnerembryofibroblastenkulturen sprechen für eine Korrelation zwischen Adaptation und Interferonproduktion. Bei besserer Adaptation werden signifikant mehr Viruspartikel pro Interferoneinheit gebildet als bei den nicht oder weniger adaptierten Varianten.

Der $E^{(-)}$-Stamm bildet bei der Saugmaus am 4. Tag und bei der erwachsenen Maus am 2. Tag im Gegensatz zum $E^{(+)}$-Stamm extrem viel Virus je Interferoneinheit. Eine Erklärung bildet die unterschiedliche Interferonsensitivität der Teststämme. Hof stellte bei dem $E^{(-)}$-Stamm 1971 in Abhängigkeit vom Titrationszeitpunkt eine wesentlich geringere Interferonsensitivität fest als bei dem $E^{(+)}$-Stamm. McLaren und Potter (1970) hingegen stellten bei 10 Influenzastämmen (A0 und A2) keine signifikanten Unterschiede in der Interferonsensitivität fest. Bei der Infektion mit dem $E^{(+)}$-Stamm wird in der Mauslunge am 2. Tag etwa die gleiche Interferonmenge je Viruseinheit gebildet wie bei den mausadaptierten Stämmen. Die Ursache dafür mag in der flachen Vermehrungskurve des $E^{(+)}$-Stammes liegen.

Im Gegensatz zu der oben genannten Korrelation zeigen die adaptierten Stämme in den Mäuseembryofibroblastenkulturen wesentlich höhere Interferontiter als die nicht adaptierten Stämme. Der $BM^{(-)}$-Stamm verhält sich dabei wie ein Eistamm. Die Korrelation von hoher Adaptation und geringer Interferonproduktion trifft also bei der Mausspezies nur für den Gesamtorganismus zu.

Wir bestätigen für das Influenza-Virus die von Wagner (1963) für das VSV-Virus gefundenen Zusammenhänge zwischen Adaptation und Interferonproduktion.

Link et al. (1965) berichteten in der Untersuchung über "Relationship between virus multiplication and interferon production in mouse lungs after infection with

adapted and unadapted influenza viruses" mit Influenza-Virus A2/Singapore/1957, daß die nicht adaptierten Varianten nur den 12ten Teil Interferon produzieren wie die adaptierten, bezogen auf einen Virustiter von $10^{4,4}$ EID_{50} bzw. $10^{5,6}$ EID_{50}.

Bereits 1964 ergaben Versuche derselben Autoren im Laufe der Adaptation nach der 4. bis 5. Passage einen signifikanten Anstieg der Interferonbildungsfähigkeit.

1966 stellten Inglot und Mitarbeiter in der Arbeit "Changes in the production of interferon in the process of adaptation of influenza type A2 virus to the mouse lung" fest, daß die Infektion mit den besser adaptierten Viren einen stärkeren Stimulus für die Interferonsynthese bedeutet als die nicht adaptierten Viren.

McLaren und Potter (1970) stellten fest, daß die virulenteren Influenzastämme in der Regel in den ersten 4 Tagen nach der Infektion höhere Virustiter erreichten als die weniger virulenten Stämme. Sie induzierten auch die höchsten Interferontiter. Jedoch führten sie auch Ausnahmen an, bei denen gleiche Virusvermehrung mit großen Unterschieden in der Interferonproduktion einherging. Sie hielten es für möglich, daß einige der Viren mehr Virus-RNA zur Bildung derselben Zahl von Viruspartikeln benötigten als die anderen. Die RNA-Überproduktion würde aber gleichzeitig eine starke Stimulierung für die Interferonproduktion bedeuten.

Betrachtet man dazu in vorliegender Arbeit die graphische Gegenüberstellung von Interferontiter und Virustiter hinsichtlich des Adaptationsgrades der Varianten in den Abbildungen 3b, 3c, 4b, 4c, 4f, 4g, 5b, 5c, 5f und 5g, so ergibt sich zunächst eine scheinbare Übereinstimmung mit den Ergebnissen der letztgenannten Autoren. Bis auf wenige Ausnahmen atypischen Verhaltens zeigen die adaptierten Varianten stärkere Vermehrung, gefolgt von größerer Interferonproduktion. Betrachtet man jedoch die pro Viruseinheit (in HA bzw. EID_{50}) gebildete Interferon-

menge (in PDD_{50}), so ergibt sich, daß adaptierte Viren tatsächlich weniger Interferon induzieren als nicht adaptierte.

6.5 Weitere Faktoren, die Adaptation und Interferonwirkung beeinflussen

Als ein weiterer Faktor wurde von Takemoto und Baron (1966) die Resistenz gegenüber dem Interferonsystem durch einen Teil der Viruspopulation genannt. Bei seinen Untersuchungen konnten sich 10 - 15% der Population des Encephalomyokarditis-Virus in interferonbehandelten Mausembryokulturen vermehren. Dabei variiert der Anteil in Abhängigkeit vom Virustyp, der Zellsorte und dem verwendeten Medium. Inwieweit in unseren Untersuchungen die adaptierten Virusstämme resistenter gegen die Interferonwirkungen sind, läßt sich nicht sicher abschätzen.

In seinen Untersuchungen über die Interferonsensitivität von Influenzastämmen (H2N2) stellt Hof (1971) eine wesentlich geringere Interferonsensitivität des $E^{(-)}$-Stammes gegenüber dem $E^{(+)}$-Stamm fest. Das atypische Verhalten des $E^{(-)}$-Stammes mag darin seine Erklärung finden. Inwieweit die unterschiedliche Virusproduktion je Interferoneinheit bei den adaptierten und nicht adaptierten Teststämmen sich auf diesen Mechanismus zurückführen läßt, bleibt offen.

1966 wurde von Wagner und Huang die Hypothese einer virusbedingten Hemmung des Interferonsystems aufgestellt. Sie stellten in der Arbeit "Inhibition of RNA and interferon-synthesis in Krebs-2 cells infected with vesicular stomatitis virus" bei großem VSV-Ertrag eine Reduktion der intrazellulären RNA Synthese fest. Da die RNA bei der Synthese des Interferonproteins beteiligt ist, kommt es dadurch zu einer Verminderung der Interferonproduktion. Auch diese Tatsache mag zum Teil die geringere Interferon-

produktion je Viruseinheit bei den adaptierten Varianten unseres Versuchs erklären, v.a. wenn man die schnellere und höhere Anfangsvermehrung der adaptierten Viren gegenüber den nicht adaptierten berücksichtigt. Link und Mitarbeiter (1965) beschrieben nämlich, daß die anfängliche Differenz im Virusertrag nach Infektion mit gleichen Dosen von adaptiertem und nicht adaptiertem Virus erklärt werden kann als die Fähigkeit des adaptierten Virus, zu Beginn rasch mehrere Vermehrungszyklen in Gang zu setzen.

6.6 Korrelation zwischen Inhibitorempfindlichkeit und Interferonproduktion

Briody et al. (1955) fanden heraus, daß der Verlust der Empfindlichkeit gegenüber Beta-Serum-Inhibitoren ein Charakteristikum bei der Adaptation von einigen Influenzavirusstämmen an die Mauslunge ist. 1965 stellten Link und Mitarbeiter in dem Artikel "Interferonformation during virus adaptation" fest, daß während der Adaptation von Influenza A1-Virus an die Mauslunge zwischen der 3. und 4. Passage plötzlich ein deutlicher Rückgang der Beta-Inhibitorempfindlichkeit mit einem starken Anstieg der Interferonproduktion einhergeht. Beta-Inhibitoren sind thermolabil. Bei der Inhibitorempfindlichkeit unserer Teststämme handelt es sich jedoch um eine stammcharakteristische Empfindlichkeit gegen thermostabile Pferde- und Hühnerseruminhibitoren von Glycoproteincharakter. Die Pferdeseruminhibitoren wandern in der Elektrophorese mit den Albuminen und Gammaglobulinen (Tamm und Choppin 1960b).

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß bei der Infektion mit den Plus- und Minusstämmen in der Interferonproduktion je Viruseinheit in Ei, Maus und Saugmaus, HEF- und MEF-Zellkulturen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Atypisches Verhalten zeigt jedoch der $E^{(-)}$-Stamm, der im Vergleich zum $E^{(+)}$-Stamm in der Lunge der erwachsenen Maus am 2. Tag und der Saugmaus am 4. Tag deutlich

weniger Interferon je Viruseinheit induziert als der $E^{(+)}$-Stamm. In der Mäuseembryofibroblastenkultur induziert er jedoch deutlich mehr Interferon als der inhibitorempfindliche $E^{(+)}$-Stamm. Mit der fast vollständigen Inhibitorunempfindlichkeit des $E^{(-)}$-Stammes gegen Pferde- und Hühnerseruminhibitoren korreliert eine gegenüber dem $E^{(+)}$-Stamm geringe Interferonsensitivität in Hühnerembryofibroblasten (Hof 1971).

Die Schematisierung in "Plus"- und "Minus"-Stämme ist jedoch problematisch. Die Unterschiede in der Seruminhibitorempfindlichkeit sind z.T. gradueller Art. Als Kriterium wurde der Hemmtiter von 3 mit Pferdeseruminhibitoren in der HAD festgesetzt. Nur beim $E^{(-)}$-Stamm fehlt die Seruminhibitorempfindlichkeit nahezu völlig.

Neben den graduellen Unterschieden lassen sich aber auch quantitative Unterschiede feststellen, die erkennbar werden, wenn man die Hemmwirkung von Seren verschiedener Spezies vergleicht (Gerth in Druck).

7. Zusammenfassung

Die Adaptation der hier verwendeten Influenza-Stämme (H2N2) korreliert im Brutei und der Lunge von Saugmaus und erwachsener Maus gleichsinnig mit der Virusvermehrung.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in der Maus- und Saugmauslunge korrelieren im Brutei hohe Virustiter mit niedrigen Interferontitern, während in der Maus und Saugmaus mit Ausnahme des $E^{(-)}$-Stammes hohe Virustiter grob quantitativ mit hohen Interferontitern korrelieren.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen Adaptation und Interferonproduktion zeigt sich sowohl im Brutei nach 76 Stunden wie in der Lunge von Saugmaus am 2. und 4. Tag nach Infektion, in der Lunge der erwachsenen Maus am 4. Tag als auch in den Hühnerembryofibroblastenkulturen. Bei den adaptierten Stämmen werden im Laufe der Infektion mit Influenzavirus mehr Viruspartikel pro Interferoneinheit gebildet als bei den nicht adaptierten Stämmen, bzw. weniger Interferon pro Viruseinheit bei den adaptierten Teststämmen.

Als Ursachen hierfür wurden die Adsorptionsfähigkeit und die Geschwindigkeit der Anfangsvermehrung in Abhängigkeit von der Adaptation diskutiert. Im weiteren wurden die Faktoren der Virusresistenz, der Virussensitivität gegenüber Interferon und der Mechanismus der Substratkonkurrenz zwischen Virus- und RNA-Synthese besprochen. Letztere steht in engem Zusammenhang zur Interferonproduktion. Die Bedeutung dieser Faktoren für die Virus- und Interferonproduktion ist abhängig vom Titrationszeitpunkt im Infektionsablauf - was ihre Deutung erschwert.

8. Literaturverzeichnis

1. BARON, S., BUCKLER, C.E.
Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus.
Science 141, 1061 - 1063 (1963)

2. BARON, S., DU BUY, H. G., BUCKLER, C.E., JOHNSON, M.L.
Relationship of interferon production to virus growth in vivo.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 117, 338, - 343 (1964)

3. BAUR, E.
Adaptation von Influenza-A2-Viren an die neugeborene Maus.
Dissertation 1970

4. BRIODY, B.A., CASSEL, W.A., MEDILL, M.A.
Adaptation of influenza virus to mice.
II. Changes in the growth curve of an A prime strain of influenza virus.
J. Imm. 74, 37 - 41 (1955)

5. CAVALLI-SFORZA, L.
Grundbegriffe der Biometrie
Stuttgart: Gustav Fischer 46 - 49, 159 - 168 (1964)

6. CHOPPIN, P.W., TAMM, I.
Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains.
(a) I. Characterization of stable homogenous substrains in reactions with spezific antibody, mucoprotein inhibitors and erythrocytes.
(b) II. Reactivity with virus inhibitors in normal sera.
J. exp. Med. 112, 895 - 944 (1960)

7. CLARKE, D.H., CASALS, J.
Techniques for haemagglutination with arthropod borne viruses.
Am. J. Trop. Hyg. Vol. 7, 5, 561 - 573 (1958)

8. CRAIGHEAD, J.E.
Growth of parainfluenza type 3 virus and interferon production in infant and adult mice.
Brit. J. Exp. Path. 47, 235 - 241 (1960)

9. DULBECCO, R.

Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.

Proc. Nat. acad. Sci. U.S. 38, 747 - 752 (1952)

10. EXPERT COMMITTEE ON RESPIRATORY VIRUS DISEASES

First report

Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser. 170, (1959)

11. FANTES, K.H.

Purification of interferon from chick embryonic allantoic fluids and fibroblast tissue infected with influenza virus.

J. gen. Virol. 1, 257 - 267 (1967)

12. FINNEY, D.J.

Probit Analysis
London: Cambridge Univ. Press 264 - 267 (1952)

13. FINTER, N.B.

Quantitative haemadsorption, a new assay technique. I. Assay of interferon.

Virology 24, 589 - 597 (1964)

14, FOGH, J.F. and LUND, R.O.

Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 94, 532 - 537, (1957)

15. GERTH, H.J.

Über die Variabilität von Influenza A2-Viren.

Habilitationsschrift Tübingen (1968)

16. GERTH, H.J.

In vitro-Charakteristika von genetisch weitgehend homogenen Influenzavirus A2-Stämmen.

Arch. ges. Virusforsch. 30, 275 - 290,(1970)

17. GERTH, H.J.

Änderung der Mucoproteinaffinität von Influenza A2-Stämmen nach Mausadaptation.

(Im Druck)

18. GERTH, H.J.

Adaptation von Influenza A2-Varianten an die Lunge der erwachsenen Maus. (unveröffentlicht, in Vorbereitg.)

19. GLASGOW, L.A.
Interrelationship of interferon and immunity during viral infections.
J. Gen. Physiol. 56, 212 S - 226 S (1970)

20. HEINEBERG, H., GOLD, E., ROBBINS, F.C.
Differences in interferon content in tissue of mice of various ages infected with Coxsackie B1 virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 115, 947 - 953 (1964)

21. HO, M.
Role of infection in viral interference.
I. Inhibition of lethal infections in chick embryos preinfected with influenza viruses.
Arch. Internal. Med. 110, 653 - 659 (1962)

22. HOF, H.
Vergleich der Interferonsensitivität von verschiedenen Influenza A2-Stämmen mit Hilfe der Hämadsorptionsmethode
Dissertation 1971

23. INGLOT, A.D., LOBODZINSKA, M., BIERNACKA, J., NIEDZWIEDZKA, E.
Changes in the production of interferon in the process of adaptation of influenza type A2 virus to the mouse lung.
Arch. Immunol. et Ther. Exper. 14, 333 - 338 (1966)

24. ISAACS, A., BARON, S.
Antiviral action of interferon in embryonic cells.
Lancet 2,946 - 947(1960)

25. ISAACS, A., HITCHCOCK, G.
Role of interferon in recovery of virus infections.
Lancet II, 69 - 71 (1960)

26. ISAACS, A., LINDENMANN, J.
Viurs interference. I. The interferon.
Proc. Roy. Soc. Ser. B. 147, 258 - 267 (1957)

27. KÄRBER, G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 162, 480 - 483 (1931)

28. KENDAL, A.P., ALLAN, W.H.
Comparative studies of Newcastle disease viruses.
I. Virulence, antigenic spcifity and growth kinetics.
Microbios 2, 273 - 284 (1970)

28. LENNETTE, E., SCHMIDT, N.
Diagnostic procedures in viral and rickettsial diseases.
U.S. Public Health Association Inc. New York (1964)

29. LINDENMANN, J., GIFFORD, G.E.
Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon.
III. A simplified plaque inhibition assay of interferon.
Virology 19, 302 - 309 (1963)

30. LINK, F., RAUS, J.
Multiplication of mouse adapted influenza virus in mouse lungs after infection with very low dosis.
Nature 192, 478 - 479 (1961)

31. LINK, F., BLASCOVIC, D., RAUS, J.
Interferon formation during virus adaptation.
Acta virol. 8, 561 (1964)

32. LINK, F., BLASCOVIC, D., RAUS, J.
Relationship between virus multiplication and interferon production in mouse lungs after infection with adapted and unadapted influenza viruses.
Acta virol. 9, 95)1965)

33. LORENZ, R.J.
Untersuchungen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Genauigkeit bei Virustitrierungen.
Arch. ges. Virusforsch. 10, 560 - 577 (1960)

34. McLAREN, L.C., and POTTER, C.W.
The relationship between interferon and virus virulence in influenza virus infections of the mouse.
J. Med. Microbiol. 6, 21 - 32 (1973)

35. MORGAN, J.F., MORTON, H.J., and PARKER, R.C.
Nutrition of animal cells in tissue culture.
I. Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 73: 1 - 8,(1950)

36. RUIZ-GOMEZ, J., ISAACS, A.
Interferon production by different viruses,virology 19, 8 - 12 (1963)

37. SAWICKI, L.

Influence of age of mice on interferon from Sendai virus infection.

Nature 192, 1258 - 1259 (1961)

38. TAKEMOTO, K.K., BARON, S.

Non-heritable interferon resistance in a fraction of virus populations.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 121, 670 - 675 (1966)

39. WAGNER, R.R., HUANG, A.S.

Inhibition of RNA and interferon synthesis in Krebs-2 cells infected with vesicular stomatitis virus.

Virology 28, 1 - 10 (1966)

40. WAGNER, R.R., LEVY, A.H., SNYDER, R.M., RATCLIFF,G.A. HYATT, D.F.

Biologic properties of two plaque variants of vesicular stomatitis virus (indiana serotype)

J. Immunol. 91, 112 - 122 (1963)

41. WERTZ, G., W., YOUNGNER,J.S.

Interferon production and inhibition of host synthesis in cells infected with vesicular stomatitis virus.

J. Virol. 6, 476 - 484 (1970)

Die Arbeiten wurden an der Abteilung für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten am Hygiene-Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. med. R. E. Bader) durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die mannigfaltigen Anregungen und die stets hilfsbereite Leitung bei der Durchführung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. H. J. Gerth zu großem Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Geburt am 1. Juli 1944 in Aalen als Sohn des Kaufmanns Walter Hezel und seiner Ehefrau Paula, geb. Hagmaier.

Grundschule und Gymnasium in Aalen vom 1.9.1950 bis zum Abitur am 13.3.1963.

Medizinstudium an den Universitäten Münster und Tübingen vom 30.10.1963 - 25.7.1970. Zusatzprüfung: Latinum. Ärztliche Prüfung am 25.7.1970.

Pflichtzeit als Medizinalassistent im Hygiene-Institut der Universität Tübingen und am Kreiskrankenhaus Nürtingen. Approbation am 2.6.1972.

Innere Assistenzarzttätigkeit am Kreiskrankenhaus Nürtingen vom 3.6.1972 - 30.4.1973, unterbrochen durch den Pflichtwehrdienst als vorl. Stabsarzt vom 4.12.1972 - 3.3.1973.

Anschließend ein zweisemestriges Zusatzstudium in Soziologie/Sozialpsychologie an der Universität Frankfurt vom 1.4.1973 - 28.2.1974. In den Semesterferien für 10 Wochen Tätigkeit als Landpraxisvertreter. Assistenzarzttätigkeit an der Psychosomatischen Klinik Kinzigtal, Bad Herrenalb, vom 4.3.1974 - 31.5.1974.